



# 油茶地蜂中四个寡糖代谢相关基因克隆及其在大肠杆菌体内表达\*

徐天羽<sup>1,2\*\*</sup> 李震<sup>3\*\*</sup> 曾志将<sup>1,2\*\*\*</sup>

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045; 2. 蜜蜂生物学与饲养江西省重点实验室, 南昌 330045;

3. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 宜春 336000)

**摘要** 【目的】油茶授粉效率很低, 存在“百花一果”现象, 严重影响油茶产业发展。人工饲养的东方蜜蜂 *Apis cerana* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 虽具广泛授粉适应性, 却受油茶花中寡糖影响, 出现中毒症状。野生油茶地蜂 *Andrena camellia* 能为油茶有效授粉, 可以依靠自身肠道分泌的 4 种关键酶消化油茶蜜、粉中的寡糖, 但数量有限。为了解决油茶授粉难题, 我们克隆了油茶地蜂体内 4 种寡糖代谢酶。【方法】通过基因组测序成功获得了  $\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -Galactosidase,  $\alpha$ -GAL)、半乳糖激酶 (Galactokinase, GALK)、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶 (Galactose-1-phosphate uridylyltransferase, GALT) 和尿苷二磷酸半乳糖-4'-变位酶 (Uridine diphosphate galactose-4'-epimerase, GALE) 4 个与寡糖代谢相关的关键基因编码区序列, 并构建了重组表达质粒 pET28a- $\alpha$ -GAL、pET28a-GALK、pET28a-GALT、pET28a-GALE 及大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达工程菌株 pET28a-GAL-*E. coli* BL21、pET28a-GALK-*E. coli* BL21、pET28a-GALT-*E. coli* BL21 和 pET28a-GALE-*E. coli* BL21。【结果】对  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 进行了诱导表达和 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱亲和层析纯化, 获得纯化后的  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 的蛋白分子量分别约 53、55、48 和 39 kD, 浓度分别为 0.8、1.5、0.9 和 1.0 mg/mL。【结论】本研究成功克隆油茶地蜂寡糖代谢相关基因并获得重组表达蛋白, 研究结果为破解蜜蜂访问油茶后中毒的“瓶颈”提供了新思路和方法, 为科学利用蜜蜂为油茶授粉提供了技术支撑。

**关键词** 油茶地蜂; 油茶; 蜜蜂; 寡糖代谢; 基因克隆; 蛋白表达

## Cloning of four oligosaccharide metabolism-related genes in *Andrena camellia* and their expression in *Escherichia coli* in vivo

XU Tian-Yu<sup>1,2\*\*</sup> LI Zhen<sup>3\*\*</sup> ZENG Zhi-Jiang<sup>1,2\*\*\*</sup>

(1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Jiangxi Province Key Laboratory of Honeybee Biology and Beekeeping, Nanchang 330045, China;

3. College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun 336000, China)

**Abstract** [Aim] To clone four *Andrena camellia* oligosaccharide metabolism-related genes and determine their expression in *Escherichia coli* in vivo. [Methods] Sequences of the coding regions of four key genes;  $\alpha$ -Galactosidase ( $\alpha$ -GAL), Galactokinase (GALK), Galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) and Uridine diphosphate galactose-4'-epimerase (GALE), were obtained through genome sequencing. Sequences of the coding regions of key genes such as  $\alpha$ -GAL, GALT, GALT and GALE were enetically engineered to obtain the recombinant expression plasmids pET28a-GAL, GALK, GALT, GALE,

\*资助项目 Supported projects: 国家蜂产业技术体系 (CARS-44-KXJ15); 国家自然科学基金 (32460137); 江西省重点实验室 (2024SSY04151)

\*\*共同第一作者 Co-first authors, E-mail: xty0111@126.com; zhenli1995@sina.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2024-10-24; 接受日期 Accepted: 2024-12-12

and the *Escherichia coli* strains pET28a- $\alpha$ -GAL-*E. coli* BL21, pET28a-GALK-*E. coli* BL21, pET28a-GALT-*E. coli* BL21, pET28a-GALE-*E. coli* BL21. **[Results]**  $\alpha$ -GAL, GALK, GALT, and GALE were subjected to induced expression and purification by Ni<sup>2+</sup>-NTA column affinity chromatography. The molecular weights of the purified  $\alpha$ -GAL, GALK, GALT, and GALE were about 53, 55, 48 and 39 kD, respectively. Corresponding concentrations of  $\alpha$ -GAL, GALK, GALT, and GALE are 0.8, 1.5, 0.9 and 1.0 mg/mL, respectively. **[Conclusion]** Genes related to oligosaccharide metabolism of *A. camellia* were successfully cloned and recombinant expressed proteins obtained. These results provide new ideas for solving the problem of honey bees being poisoned by *C. oleifera*, and provide technical support for the scientific use of honey bees for the pollination of *C. oleifera*.

**Key words** *Andrena camellia*; *Camellia oleifera*; honey bee; oligosaccharide metabolism; gene cloning; protein expression

油茶 *Camellia oleifera*, 作为山茶科山茶属 *Camellia* 的一种木本油料树种, 在我国南方已有 2 000 余年栽培历史 (陈永忠, 2023)。作为我国特有食用油料作物, 其在食用油生产中占有重要地位 (刘佳丽等, 2023; 邢凯峰等, 2024)。油茶籽油被誉为“液体黄金”, 其营养价值极高, 适合高档次的食用油开发。油茶籽油中所含的不饱和脂肪酸具有降血脂、降血压、抗衰老等保健作用, 具有良好的抗氧化性 (钟小荣, 2021)。近年来, 我国政府高度重视油茶产业的发展, 将其列为重点扶持的农业产业之一。

油茶的自交不亲和性特点使得其无法通过自我授粉实现结果, 需要依赖传粉媒介提高其授粉率和产量 (江南等, 2022)。油茶自交不亲和性是由于其花粉与柱头生理特性所决定。当花粉落到柱头时, 柱头会分泌一种特殊物质, 这种物质能够抑制花粉管生长, 从而使得自交花粉无法进入胚珠, 因此不能完成授粉过程。这种生理机制保证了油茶种群遗传多样性, 避免了近亲繁殖所带来的遗传病害和产量下降等问题。这也意味着, 只有通过传粉媒介来帮助油茶授粉才得以克服其自交不亲和性问题, 实现种群的繁衍和产量提高。但由于农业机械化、单一种植规模化以及不规范除草剂和农药使用, 使得原本为油茶授粉的优势野生昆虫数量越来越少, 比如油茶地蜂 *Andrena camellia*、大分舌蜂 *Colletes gigas*, 墨胸胡蜂 *Vespa velutina nigrithorax* 和熊蜂 *Bombus* spp., 无法满足大面积油茶种植的需求 (黄敦元等, 2017)。

蜜蜂既是一种典型模式昆虫, 是研究动物社会行为和发育生物学的理想素材 (曾志将, 2020; 陈伟轩等, 2024); 也是一种饲养历史悠久经济

昆虫, 生产出营养丰富的蜂蜜、蜂王浆、蜂花粉、蜂胶等蜂产品, 蜂产品出口为国家创大量外汇 (曾蜜等, 2023); 更是一种重要授粉昆虫, 对保障绿色农业增产和维持生态中生物多样性具有重要意义 (曾蜜等, 2022, 2024)。东方蜜蜂 *Apis cerana* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 是目前人工饲养最广泛蜂种, 具有广泛授粉适应性, 能在不同的生态环境中为多种作物授粉, 并能提高农作物的产量和质量 (雷雪萍等, 2018; 李上星等, 2018; 马卫华等, 2021)。然而油茶花中的高浓度甘露三糖、棉籽糖和水苏糖会导致蜜蜂幼虫腐烂和成年蜜蜂胀肚等中毒症状 (Li *et al.*, 2022)。这些低聚糖在蜜蜂肠道内无法被消化, 随时间积累, 严重干扰蜜蜂体内葡萄糖合成海藻糖的过程, 最终可能导致蜜蜂幼虫和工蜂个体死亡 (Li *et al.*, 2022)。蜜蜂虽然能够将摄入的 3 种低聚寡糖 (甘露三糖、棉籽糖和水苏糖) 进行部分分解来获取能量, 但其分解寡糖能力十分有限, 主要表现出以下中毒症状: 首先较高浓度的低聚糖堆积在蜜蜂体内, 无法被消化进而导致腹胀, 蜜蜂消化功能减弱, 也会使蜜蜂食物摄入量减少, 进一步加重腹胀现象; 其次分解有毒半乳糖能力减弱又会引发蜜蜂腹泻, 当分解能力下降时, 有毒半乳糖会在肠道内积累, 刺激肠道黏膜, 导致蜜蜂出现腹泻症状; 最后, 腹泻会导致水分大量丢失, 使蜜蜂脱水死亡 (Peng, 1981; Li *et al.*, 2022)。

相比之下, 油茶地蜂 *Andrena camellia* 是油茶的优势传粉昆虫, 具有典型的寡食性, 仅到访茶和油茶等山茶属植物 (邱建生, 2018)。与西方蜜蜂不同, 油茶地蜂在采食油茶花后并未出现消化不良等症状, 能有效代谢油茶中的低聚糖和

半乳糖。最新研究表明,油茶地蜂头胸部 $\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -Galactosidase,  $\alpha$ -GAL)、半乳糖激酶(Galactokinase, GALK)、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(Galactose-1-phosphate uridylyltransferase, GALT)和尿苷二磷酸半乳糖-4'-变位酶(Uridine diphosphate galactose-4'-epimerase, GALE)4个基因表达量显著高于东方蜜蜂和西方蜜蜂,而且油茶地蜂肠道中以上4个酶活性比东方蜜蜂和西方蜜蜂更强(Li *et al.*, 2024; 李震等, 2024)。这些酶在半乳糖代谢途径中发挥着关键作用,这一差异可能导致了东方蜜蜂和西方蜜蜂对半乳糖的不耐受性,会对其生存和繁殖产生不利影响,并表现出“不愿意为油茶花授粉”。本研究在成功克隆油茶地蜂这4个寡糖代谢相关基因基础上,基于大肠杆菌异源蛋白表达系统成功构建了 $\alpha$ -GAL、GALK、GALT和GALE4个基因表达菌株,并进行了诱导表达与纯化,现总结报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 菌株与质粒** 用于基因克隆和质粒保存的大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,用于异源表达重组半乳糖苷酶 $\alpha$ -GAL、GALK、GALT和GALE的大肠杆菌BL21(DE3);质粒pET-28a购自Novagen有限公司。

**1.1.2 主要试剂** T4 DNA Ligase酶购于TaKaRa公司,KOD Plus Neo DNA Polymerase

购于东洋纺公司,DNA凝胶回收试剂盒购自东盛公司。

### 1.2 仪器

GeneAmp PCR System 2400型PCR扩增仪(Applied Biosystems公司),冷冻离心机(Eppendorf公司),DYY-10C型电泳仪(北京市六一仪器厂),JY 92-IIDN超声细胞破碎仪(新芝),恒温生化培养箱(埃开 DHK 150S),BSI-9摇床(贝茵),752N紫外分光光度计(上海佑科)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT和GALE基因的克隆与表达** 从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上获取 $\alpha$ -GAL、GALK、GALT和GALE基因的编码区序列,并用Primer 5设计相应的引物来扩增以上4个序列。设计的引物序列如表1所示,由上海生工生物工程有限公司合成。上下游引物分别包含BamH I和Xho I酶切位点。以合成的 $\alpha$ -GAL、GALK、GALT和GALE基因的编码区序列为模板进行PCR扩增。扩增条件如下:94℃ 1 min;然后以98℃ 15 s;58℃ 15 s;68℃ 1 min的条件进行30个循环;68℃,5 min。反应体系包括上下游引物各0.5  $\mu$ L,模板1  $\mu$ L,2 mmol/L dNTP mixture 2.5  $\mu$ L,10  $\times$  KOD buffer 2.5  $\mu$ L,KOD Plus Neo 0.5  $\mu$ L,补水至25  $\mu$ L。在0.2 mL EP管中配制以上体系,模板稀释20倍后取0.5  $\mu$ L扩增 $\alpha$ -GAL、GALT、GALK和GALE。

表1 4个基因的引物序列  
Table 1 Primer sequences used for four genes

| 引物 Primer            | 序列 (5'-3') Sequence (5'-3')        |
|----------------------|------------------------------------|
| $\alpha$ -GAL-BamHIF | cgcgatccATGTCGACGCGTATGGATATGGT    |
| $\alpha$ -GAL-XhoIR  | ccgctcgagCTTGAACGAGTTCTGTCTGACTTTG |
| GALK-BamHIF          | cgcgatccATGAAATTTGAGAGATGGAGGA     |
| GALK-XhoIR           | ccgctcgagATGTTCTGCTCCAATCGAAATGA   |
| GALT-BamHIF          | cgcgatccATGTCTGCGTCAACAGGTGATGAGA  |
| GALT-XhoIR           | ccgctcgagCTGAGAATATTTTCTATTTACAAA  |
| GALE-BamHIF          | cgcgatccATGCAGGAAATATTGTGGGGGCC    |
| GALE-XhoIR           | ccgctcgagACATTTGTAACCGTTTGGATTATTT |

通过 PCR 扩增获得的产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳法进行分析并进行切胶和胶回收。PCR 产物经 1% 凝胶电泳后, 在紫外灯下, 用手术刀切取含目的基因片段的凝胶条带至干净 1.5 mL EP 管中, 称重后, 按 100 mg 凝胶对应 100  $\mu$ L 氯化铵基裂解溶液的比例向离心管中加入氯化铵基裂解溶液。260  $^{\circ}$ C 水浴 10 min 至凝胶完全溶化, 水浴期间振荡混合 3 次。将溶液转移至 DNA 纯化柱中, 静置 2 min, 室温 12 000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。向柱上加入 500  $\mu$ L 石油醚 (Petroleum ether, PE) 溶液, 室温 12 000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。重复上一操作一次。室温空柱 12 000 r/min 离心 1 min 以彻底去除纯化柱中残留的液体。将柱子置于新的 1.5 mL EP 管上, 向柱中央加入 30  $\mu$ L 60  $^{\circ}$ C 预热的无菌水, 13 400 r/min 离心 1 min 以洗脱出 DNA。

凝胶回收的 PCR 产物和 pET-28a(+) 载体 (Novagen 公司) 用 *Xho* I/*Bam* H I 双酶切, 回收纯化; 利用 T4 DNA Ligase 进行连接, 构建重组质粒并转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 筛选阳性克隆子和提取重组质粒 pET-28(a)-( $\alpha$ -GAL, GALK, GALT, GALE) 并酶切鉴定所提取质粒。酶切反应体系如表 2。

表 2 酶切反应体系  
Table 2 Enzymatic reaction system

| 试剂 Reagent                  | 体积 ( $\mu$ L) |
|-----------------------------|---------------|
| 提取的质粒 The extracted plasmid | 3.0           |
| <i>Xho</i> I                | 0.4           |
| <i>Bam</i> H I              | 0.4           |
| 10 $\times$ Buffer          | 1.0           |
| ddH <sub>2</sub> O          | 5.2           |
| 总计 Total                    | 10.0          |

37  $^{\circ}$ C 酶切 2 h。酶切产物以含溴化乙锭 (Ethidium bromide, EtBr) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, UVP 凝胶成像系统成像。

将重组质粒转化至 *E. coli* BL21 中, 涂布于含相应抗生素 (卡那霉素 Kanamycin, 终浓度 50  $\mu$ g/mL) 的 Luria-Bertani 培养基 (以下均简称为 LB) 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 12-16 h。从平板上挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养

基 (含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}$ C, 230 r/min 摇床培养 12-16 h, 作为预培养菌液。在 50 mL 离心管中, 用微量移液枪将 100  $\mu$ L 预培养菌液加入到 10 mL LB 培养液 (含抗生素) (1 : 100), 37  $^{\circ}$ C, 230 r/min 摇床培养 2-3 h, 使其 OD<sub>600nm</sub> 达到 0.4-0.8, 加入一定体积的 100 mmol/L 诱导物异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 使其终浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导。18  $^{\circ}$ C, 180 r/min 摇床培养过夜。

**1.3.2 蛋白表达纯化与检测** 将构建好的表达质粒 (PET-28A-( $\alpha$ -GAL, GALK, GALT, GALE)), 转化 *E. coli* BL21 表达菌, 涂布于含相应抗生素 (卡那, 终浓度 50  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 12-16 h。在超净工作台内, 从平板上挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基 (含抗生素) 中, 37  $^{\circ}$ C 230 r/min 摇床培养 12-16 h。在 50 mL 离心管中, 用微量移液枪将 100  $\mu$ L 预培养菌液加入到 10 mL LB 培养液 (含抗生素) (1 : 100), 37  $^{\circ}$ C 230 r/min 摇床培养 2-3 h, 使其 OD<sub>600 nm</sub> 达到 0.4-0.8, 进行诱导。扩大培养前, 取 200  $\mu$ L 菌液加 100  $\mu$ L 80 % 无菌甘油, 混匀后 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。诱导前, 吸出 800  $\mu$ L 菌液, 离心, 收集细菌沉淀, 悬于 40  $\mu$ L 1 $\times$ PBS (pH 7.2), 加 10  $\mu$ L 5 $\times$  SDS Buffer, 沸水浴中煮 5 min, 冻于 -20  $^{\circ}$ C, 作对照。余下的菌液加入一定体积的 100 mmol/L 诱导物 IPTG, 使其终浓度为 0.5 mmol/L。18  $^{\circ}$ C 180 r/min 摇床培养过夜。诱导后, 菌液移至 1.5 mL 离心管, 4  $^{\circ}$ C 7 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。然后用 800  $\mu$ L 1 $\times$ PBS (pH 7.2) 重悬, 同时加入终浓度为 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂苯甲磺酰氟 (Phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF)。冰上用超声破碎仪破碎细菌, 超声条件: 200 W, 工作 6 s, 间隔 6 s, 20 次。超声前, 取 40  $\mu$ L 保存, 即为总蛋白部分 (Total protein, TP), 加 10  $\mu$ L 5 $\times$ SDS Buffer, 沸水浴中煮 5 min, 冻于 -20  $^{\circ}$ C。4  $^{\circ}$ C 条件下, 以 10 000 r/min 离心 TP 10 min, 转移上清至新 EP 管中, 沉淀用 800  $\mu$ L 1 $\times$ PBS (pH 7.2) 重悬。分别取 40  $\mu$ L 上清和沉淀, 各加 10  $\mu$ L 5 $\times$

SDS Buffer, 沸水浴中煮 5 min。12% SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

蛋白表达菌株 *E. coli* BL21-PET-28A-( $\alpha$ -GAL, GALK, GALT, GALE) 复苏培养。从 -80 °C 冰箱甘油冻存管中挑取菌落划线培养于含卡那霉素(卡那, 终浓度 50  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上, 37 °C 培养箱中倒置培养过夜(12-16 h)。在超净工作台内, 从平板上挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基(含卡那霉素, 终浓度 50  $\mu$ g/mL) 中, 37 °C 230 r/min 摇床培养过夜(12-16 h)。第 2 天下午扩大培养, 在 1 L 三角瓶中, 用微量移液枪以 1:100 的比例将 2 mL 预培养菌液加入到 200 mL LB 培养液(含卡那霉素, 终浓度 50  $\mu$ g/mL), 37 °C 摇床 230 r/min 培养约 2-3 h, 使其 OD<sub>600 nm</sub> 达到 0.4-0.8。超净工作台内, 向培养液中加入 1 mL 100 mmol/L 诱导剂 IPTG, 使其终浓度为 0.5 mmol/L。18 °C 摇床 180 r/min 诱导培养过夜, 收集菌体。从摇床中取出三角瓶, 冰上放置 10 min, 其间振动 2-3 次。菌液移入干净的 50 mL 离心管中, 4 °C, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。重复离心, 直至收集到所有菌体。菌体用冰预冷的 Lysis buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Imidazole, 用 NaOH 调节 pH 7.4) 重悬, 尽量避免产生气泡, 200 mL 菌液最后重悬于 16 mL Lysis buffer 中, 冰上缓慢振摇 1 h。一共摇了 5 瓶, 共 1 L, 最后重悬于 80 mL Lysis buffer, 分装于 2 个 50 mL 离心管, 每管 40 mL。

超声破碎。冰上超声破碎 6 s, 间隔 6 s, 超声 60 次, 功率为 300 W。超声破碎结束后, 4 °C, 10 000 r/min 离心 30 min。转移上清至干净的离心管, 分别加入 1 mL Lysis buffer 预处理过的 Ni-NTA beads (购于金斯瑞公司, 能够结合带 His 标签的目的蛋白), 冰上缓慢振摇 1 h, 使 Beads 与蛋白充分结合。转移 Beads-proteins 混合溶液至 Poly-Prep 层析柱中, 使 Beads 自然沉降。用 8 mL Wash buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Imidazole, 用 NaOH 调节 pH 7.4) 洗 2 遍。最后, 用 Elution buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl,

250 mmol/L Imidazole, 用 NaOH 调节 pH 7.4) 洗脱下目的蛋白至 1.5 mL EP 管中, 洗脱 3-4 次, 每次 1 mL。

**1.3.3 蛋白含量测定** Bradford assay 测定各管蛋白浓度, 以牛血清蛋白作为标准蛋白(高木珍, 2020)。建立牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA) 标准曲线(表 3)。取 2  $\mu$ L 待测蛋白样品加入到 8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中, 充分混匀, 即稀释 5 倍; 取 100  $\mu$ L Bradford 工作液加入到 10  $\mu$ L 蛋白样品中; 室温下反应 2-5 min; 在 560 nm 波长下用紫外分光光度计测定吸光值。建立标准曲线, 计算出样品蛋白浓度。

表 3 牛血清蛋白浓度标准曲线  
Table 3 Standard curve of bovine serum protein concentration

| BSA 浓度 ( $\mu$ g/ $\mu$ L)<br>BSA concentration ( $\mu$ g/ $\mu$ L) | OD <sub>560</sub> (nm) |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 0.250                                                               | 0.571                  |
| 0.125                                                               | 0.329                  |
| 0.050                                                               | 0.186                  |
| 0.025                                                               | 0.134                  |
| 0.005                                                               | 0.094                  |
| 0                                                                   | 0.087                  |

采用 12% SDS-PAGE 法检测纯化效果。配制 12% SDS-PAGE 胶, 组装好电泳装置, 上样。蛋白 Pre-staining marker 上样 5  $\mu$ L, 蛋白样品各上样 10  $\mu$ L。接通电源, 先用 90 V 恒压电泳, 待蛋白泳动至浓缩胶与分离胶界面处, 换 110 V 恒压电泳, 至溴酚蓝距胶底部约 1 cm 时停止电泳。小心剥离胶, 放入平皿中, 加入适量考马斯亮蓝染液, 室温下, 摇床上染色 30 min。倒去染色液, 加入适量脱色液至蛋白条带清晰, 脱色过程中更换脱色液, 结果拍照保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 的基因克隆

**2.1.1 目的基因及载体的扩增和回收结果** 经过 PCR 扩增  $\alpha$ -GAL 基因序列, 电泳结果明确显示在 1.3 kb 位置成功回收到了与预期相符的基

因条带, 推测其为  $\alpha$ -*GAL* 的基因序列 (图 1)。同样地, 利用 *GALK* 的模板进行扩增, 其产物的大小与预测完全一致, 其扩增条带位于 Marker 1 500 bp 附近, 充分证明了 *GALK* 目的基因已被成功扩增 (图 2)。*GALT* 的扩增产物大小与预测

一致, 其条带位于 Marker 1 000 bp 附近, 证明 *GALT* 目的基因已被成功扩增 (图 3)。*GALE* 的扩增产物大小同样与预测相符, 其条带恰好位于 Marker 1 000 bp 的位置, 进一步确认了 *GALE* 目的基因的成功扩增 (图 4)。

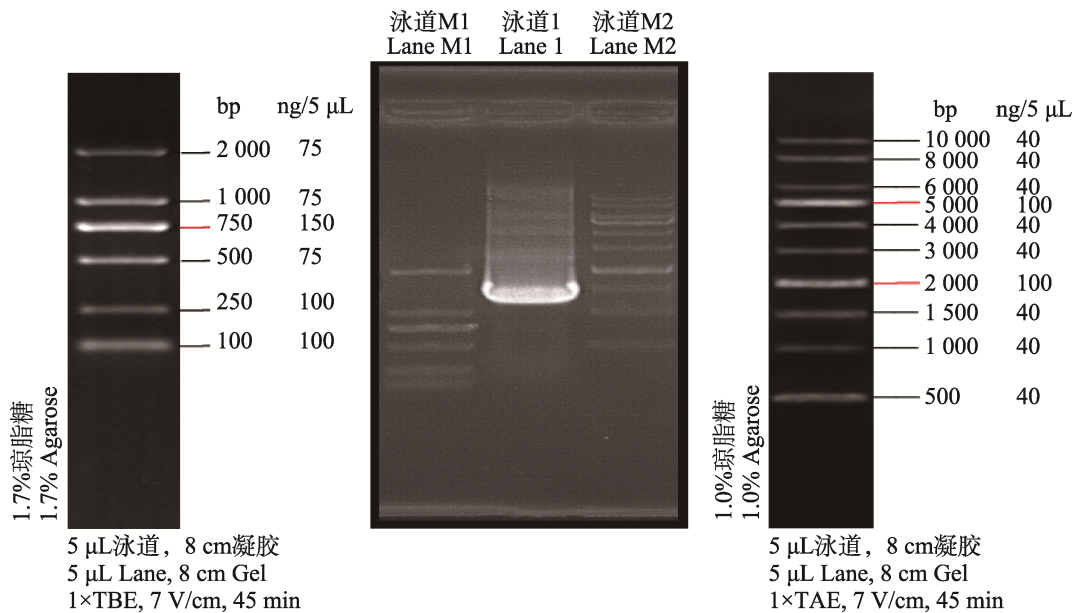


图 1  $\alpha$ -*GAL* PCR 扩增产物胶图

Fig. 1 Gel map of  $\alpha$ -*GAL* PCR amplification products

泳道 M1: DL2 000 DNA marker; 泳道 1:  $\alpha$ -*GAL* PCR 扩增产物 (1 317 bp); 泳道 M2: 1 kb DNA marker。  
Lane M1: DL2 000 DNA marker; Lane 1:  $\alpha$ -*GAL* PCR amplification product (1 317 bp); Lane M2: 1 kb DNA marker.

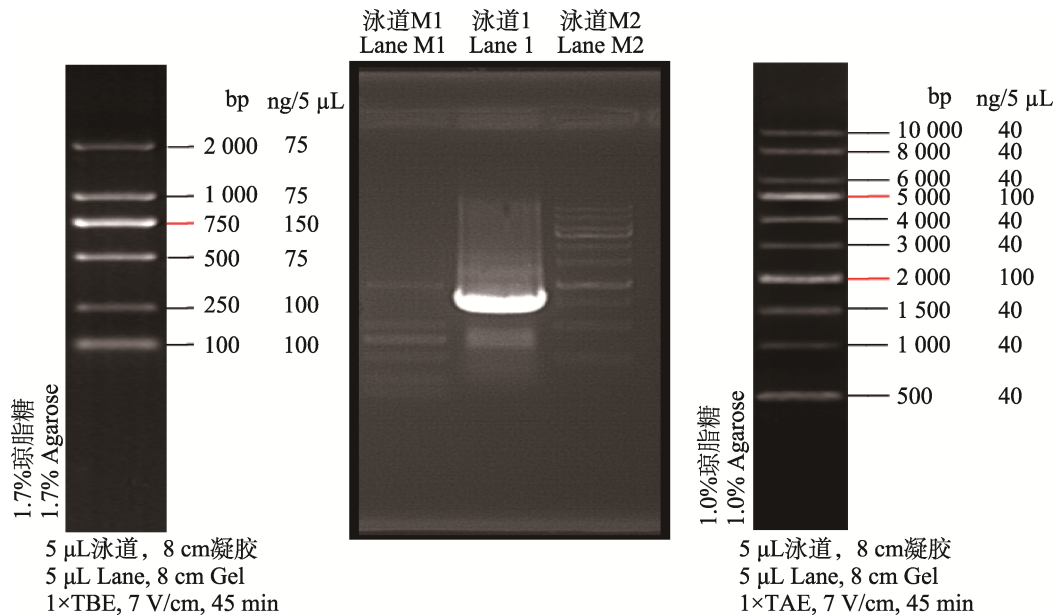
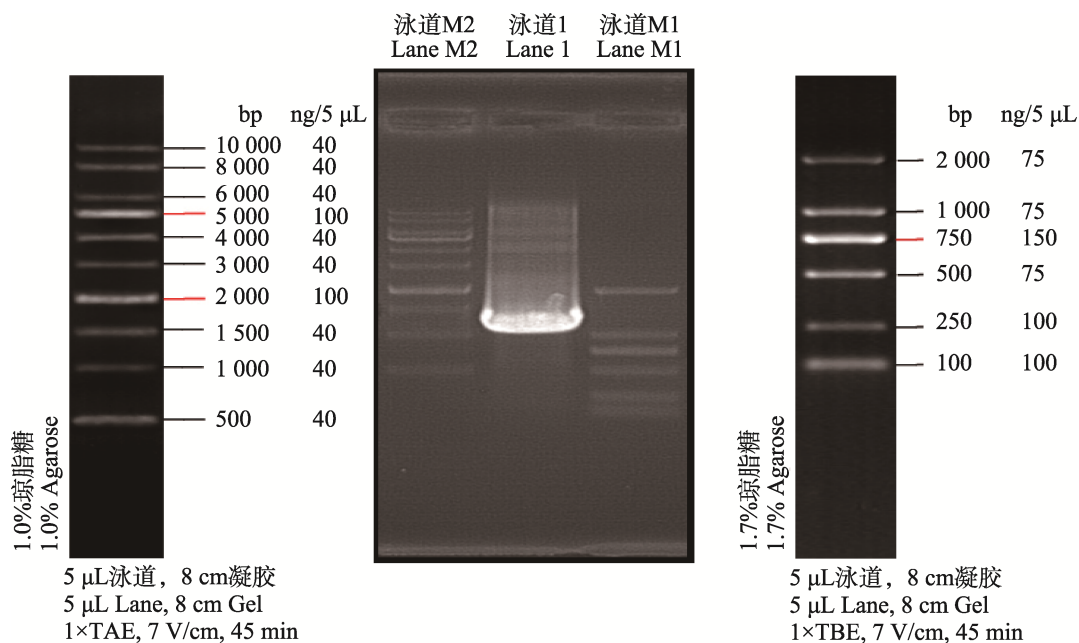


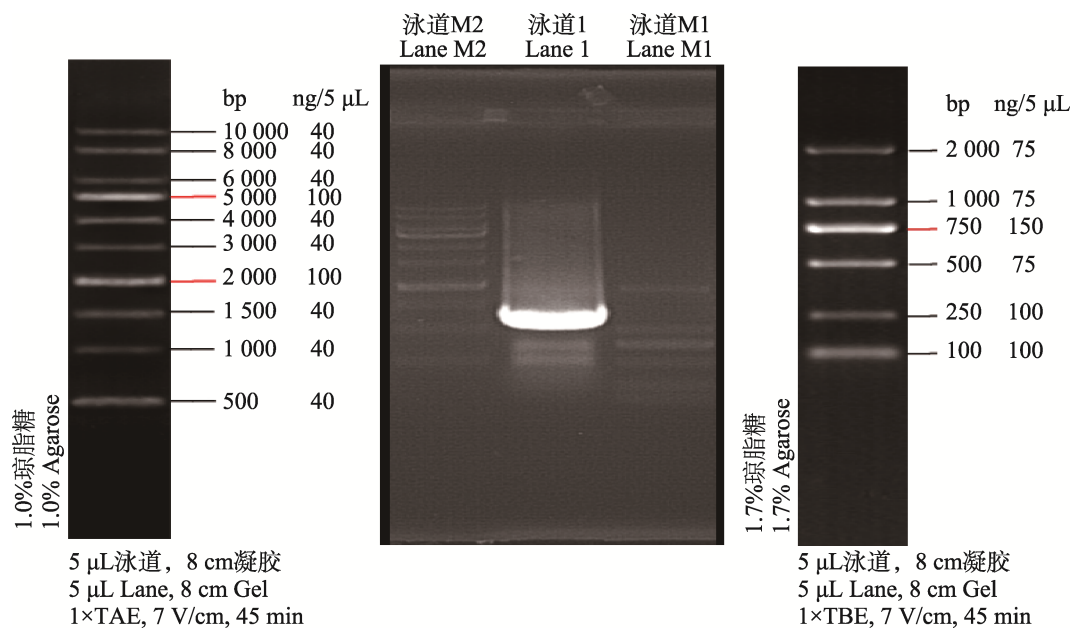
图 2 *GALK* PCR 扩增产物胶图

Fig. 2 Gel map of *GALK* PCR amplification products

泳道 M1: DL2 000 DNA marker; 泳道 1: *GALK* PCR 扩增产物 (1 362 bp); 泳道 M2: 1 kb DNA marker。  
Lane M1: DL2 000 DNA marker; Lane 1: *GALK* PCR amplification product (1 362 bp); Lane M2: 1 kb DNA marker.

图3 *GALT* PCR 扩增产物胶图Fig. 3 Gel map of *GALT* PCR amplification products

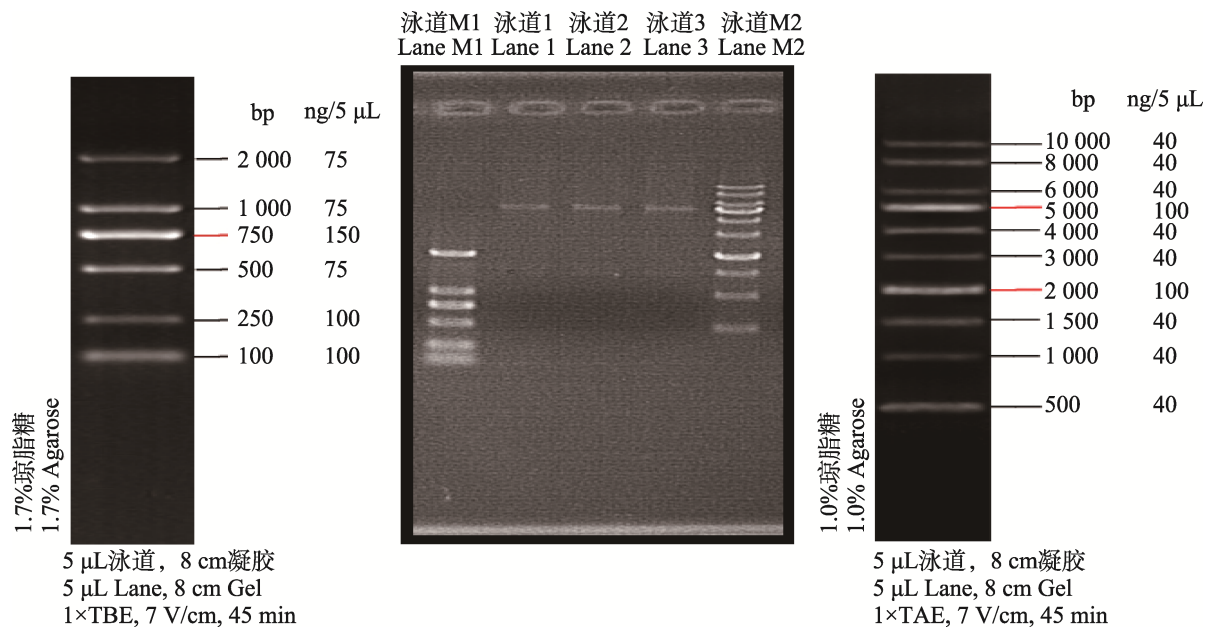
泳道 M1: DL2 000 DNA marker; 泳道 1: *GALT* PCR 扩增产物 (1 173 bp); 泳道 M2: 1 kb DNA marker。  
Lane M1: DL2 000 DNA marker; Lane 1: *GALT* PCR amplification product (1 173 bp); Lane M2: 1 kb DNA marker.

图4 *GALE* PCR 扩增产物胶图Fig. 4 Gel map of *GALE* PCR amplification products

泳道 M1: DL2 000 DNA marker; 泳道 1: *GALE* PCR 扩增产物 (966 bp); 泳道 M2: 1 kb DNA marker。  
Lane M1: DL2 000 DNA marker; Lane 1: *GALE* PCR amplification product (966 bp); Lane M2: 1 kb DNA marker.

**2.1.2 重组质粒酶切鉴定及测序** 酶切提取的重组质粒, 酶切产物以含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 UVP 凝胶系统成像, 电泳结果显示  $\alpha$ -*GAL* (1 317 bp) (图 5)、*GALK*

(1 362 bp) (图 6)、*GALT* (1 173 bp) (图 7) 和 *GALE* (966 bp) (图 8) 在相应的位置切出一条目的条带, 说明筛到有阳性克隆, 将阳性质粒送到上海生工基因公司测序。测序结果 BLAST

图5  $\alpha$ -GAL 的重组质粒酶切后产物胶图Fig. 5 Gel map of the product after plasmid digestion of  $\alpha$ -GAL

泳道 M1: DL2 000 DNA marker; 泳道 1:  $\alpha$ -GAL-1 的质粒酶切后产物; 泳道 2:  $\alpha$ -GAL-2 的质粒酶切后产物;  
泳道 3:  $\alpha$ -GAL-3 的质粒酶切后产物; 泳道 M2: 1 kb DNA marker。

Lane M1: DL2 000 DNA marker; Lane 1: Plasmid digested product of  $\alpha$ -GAL-1; Lane 2: Plasmid digested product of  $\alpha$ -GAL-2; Lane 3: Plasmid digested product of  $\alpha$ -GAL-3; Lane M2: 1 kb DNA marker.

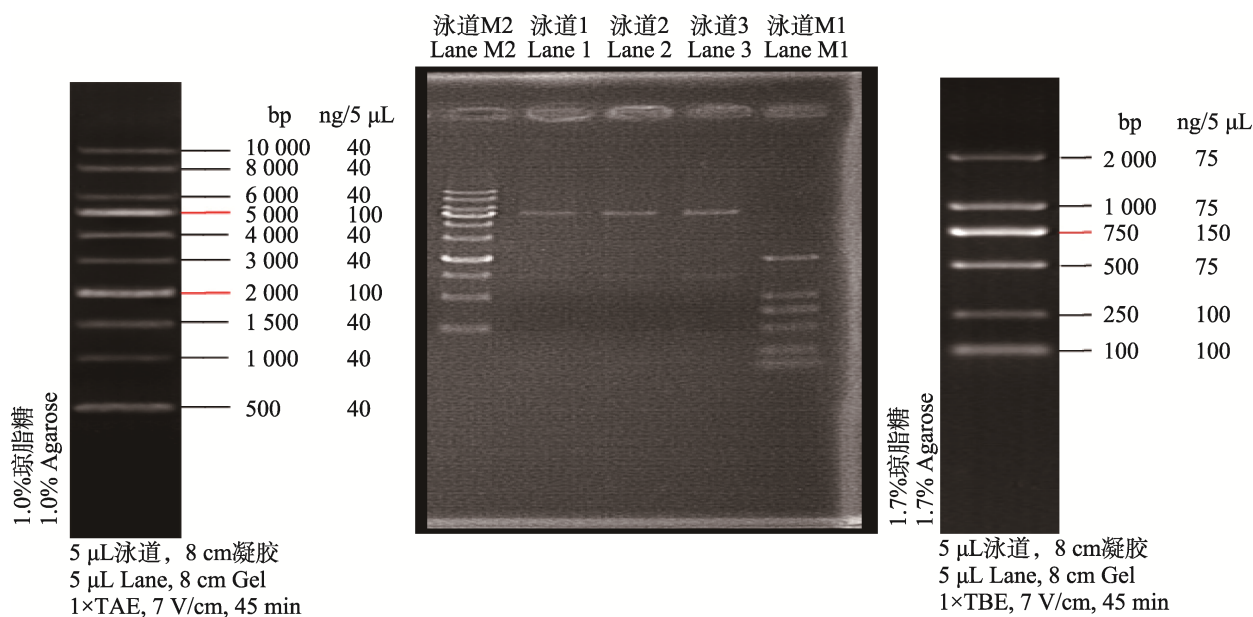
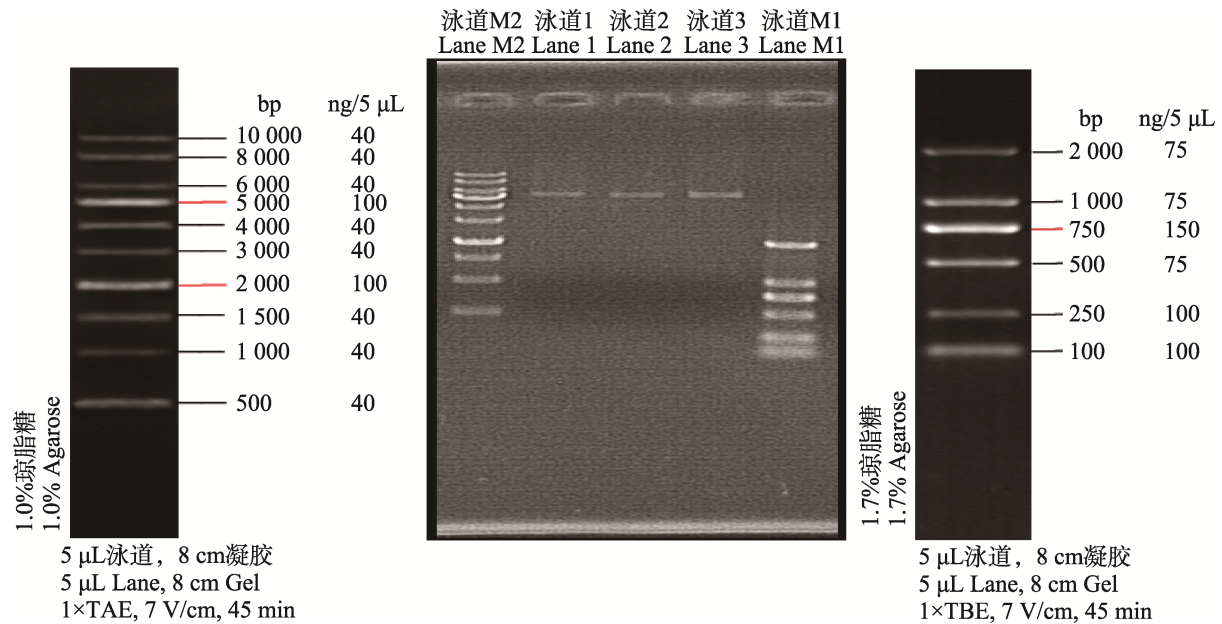


图6 GALK 的重组质粒酶切后产物胶图

Fig. 6 Gel map of the product after plasmid digestion of GALK

泳道 M2: 1 kb DNA marker; 泳道 1: GALK-1 的质粒酶切后产物; 泳道 2: GALK-2 的质粒酶切后产物;  
泳道 3: GALK-3 的质粒酶切后产物; 泳道 M1: DL2 000 DNA marker。

Lane M2: 1 kb DNA marker; Lane 1: Plasmid digested product of GALK-1; Lane 2: Plasmid digested product of GALK-2;  
Lane 3: Plasmid digested product of GALK-3; Lane M1: DL2 000 DNA marker.

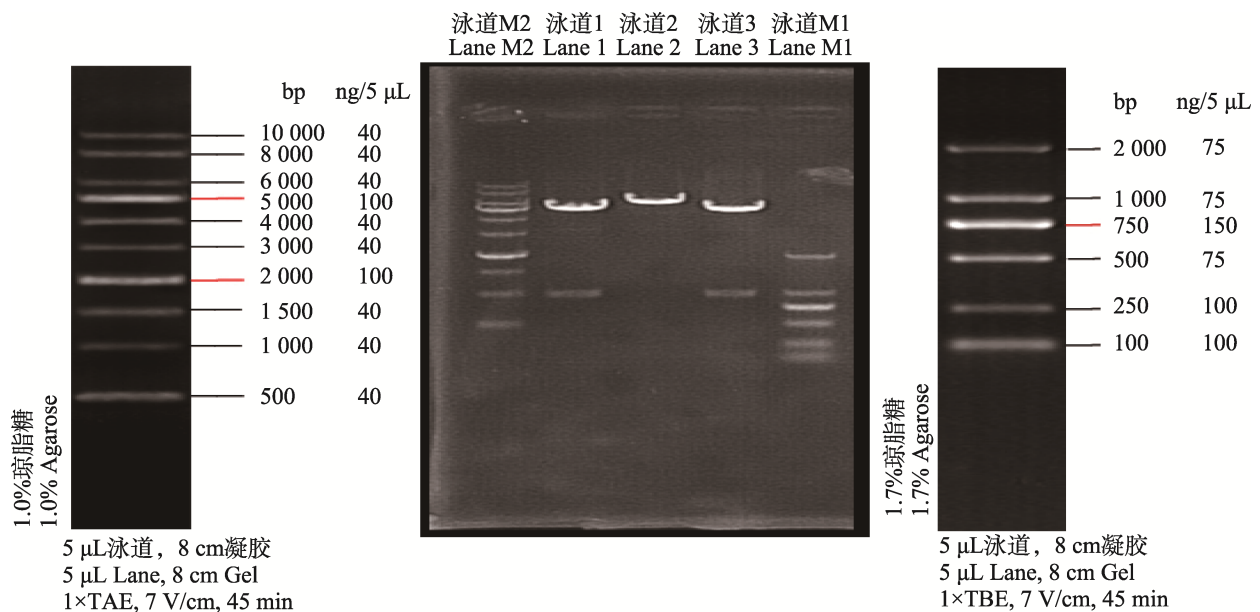
图 7 *GALT* 的重组质粒酶切后产物胶图Fig. 7 Gel map of the product after plasmid digestion of *GALT*

泳道 M2: 1 kb DNA marker; 泳道 1: *GALT-1* 的质粒酶切后产物; 泳道 2: *GALT-2* 的质粒酶切后产物;

泳道 3: *GALT-3* 的质粒酶切后产物; 泳道 M1: DL2 000 DNA marker。

Lane M2: 1 kb DNA marker; Lane 1: Plasmid digested product of *GALT-1*; Lane 2: Plasmid digested product of *GALT-2*;

Lane 3: Plasmid digested product of *GALT-3*; Lane M1: DL2 000 DNA marker.

图 8 *GALE* 的重组质粒酶切后产物胶图Fig. 8 Gel map of the product after plasmid digestion of *GALE*

泳道 M2: 1 kb DNA marker; 泳道 1: *GALE-1* 的质粒酶切后产物; 泳道 2: *GALE-2* 的质粒酶切后产物;

泳道 3: 分别为 *GALE-3* 的质粒酶切后产物; 泳道 M1: DL2 000 DNA marker。

Lane M2: 1 kb DNA marker; Lane 1: Plasmid digested product of *GALE-1*; Lane 2: Plasmid digested product of *GALE-2*;

Lane 3: Plasmid digested product of *GALE-3*; Lane M1: DL2 000 DNA marker.

分析:  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT、GALE 均已成功克隆至 pET-28a+载体中, 与 NCBI 上已知序列进行 BLAST 100%一致。

2.2 目的蛋白的 SDS-PAGE 分析

采用 IPTG 分别对  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 进行诱导表达。如图 9 所示, SDS-PAGE 结果表明  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GAL 在构建成功的基因工程菌中获得了大量可溶性表达。重组菌经 IPTG 诱导表达、分离和纯化后, 纯酶用 SDS-PAGE 检测, 显示单一条带, 纯化后的  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 的蛋白分子量分别约 53、55、48 和 39 kD。

2.3 蛋白含量检测标准曲线

本研究获得的蛋白浓度标准曲线的线性回归方程是  $y=1.940x+0.086$ , 其  $R^2$  为 0.999。根据其吸光度对照标准曲线可以计算出纯化后的  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 浓度分别为 0.8、1.5、0.9 和 1.0 mg/mL (表 4)。

3 讨论

油茶已被正式列入国家大宗油料作物名录, 我国当前种植面积超 460 万  $\text{hm}^2$ , 预计 2025 年将突破 600 万  $\text{hm}^2$  (王哲和朱香明, 2023)。油茶有传粉昆虫 50 余种, 其中优势授粉昆虫为油

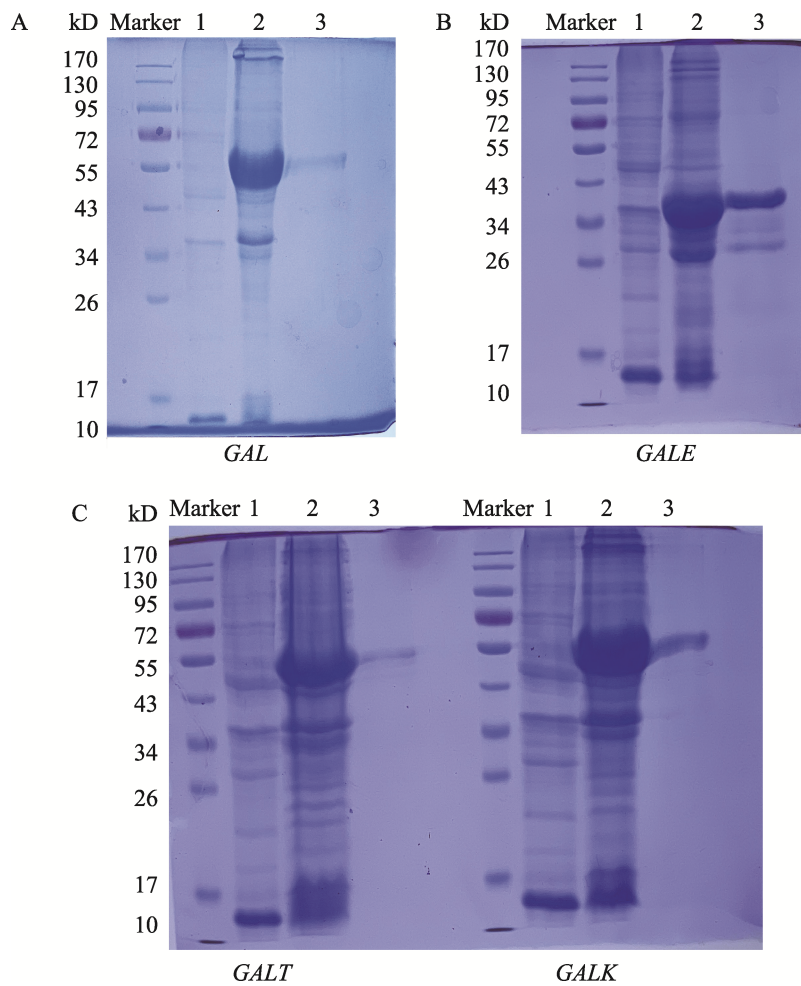


图 9 GAL (A)、GALE (B)、GALK 和 GALT (C) 的蛋白质纯化检测凝胶图  
Fig. 9 Protein purification assay gel plots of GAL (A), GALE (B), GALK and GALT (C)

泳道 1: 诱导前总蛋白; 泳道 2: 诱导后总蛋白; 泳道 3: 纯化后总蛋白。  
Lane 1: Total protein before induction; Lane 2: Total protein after induction; Lane 3: Total protein after purification.

表 4  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 蛋白吸光度  
Table 4 Absorbance of  $\alpha$ -GAL, GALK, GALT and GALE proteins

|                       | $\alpha$ -GAL | GALK  | GALT  | GALE  |
|-----------------------|---------------|-------|-------|-------|
| OD <sub>600 nm</sub>  | 0.162         | 0.227 | 0.169 | 0.180 |
| 浓度 (mg/mL)            | 0.8           | 1.5   | 0.9   | 1.0   |
| Concentration (mg/mL) |               |       |       |       |

茶地蜂和大分舌蜂 (邓园艺等, 2010)。近 20 多年来, 由于油茶林场作物种植单一, 且种植采取“毁林种植”和“精耕细作”的方式, 严重破坏了野生传粉蜂的栖息地, 造成野生油茶林授粉昆虫种类和数量锐减, 导致座果率进一步下降 (Xie *et al.*, 2013)。

应用商业化饲养的东方蜜蜂和西方蜜蜂为油茶授粉, 一直是研究热点和科研主攻方向。但在实际生产中, 蜜蜂采集油茶后, 会出现蜜蜂幼虫和蛹腐烂以及工蜂腹胀等中毒症状。针对油茶蜜粉导致蜜蜂中毒有两种传统学术观点: 一是油茶花蜜中含有的生物碱 (赵尚武, 1987), 二是油茶花蜜中含有的寡糖 (棉籽糖和水苏糖) (康雪冬和范正友, 1991)。研究发现, 油茶花蜜、花粉和蜂蜜中含有 2 种生物碱山道年和咖啡因, 但不是蜜蜂中毒原因; 油茶花蜜中的水苏糖, 棉子糖和甘露三糖是导致蜜蜂中毒和烂仔的主要物质 (Li *et al.*, 2022), 其机理是在寡糖和半乳糖代谢通路中, 东方蜜蜂和西方蜜蜂中  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 4 种酶基因表达水平和酶活性都显著低于油茶地蜂 (Li *et al.*, 2024)。如何解决蜜蜂采集油茶蜜粉中毒问题, 生物工程合成  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 4 种酶, 是最优先的蜜蜂为油茶授粉策略, 也是本研究团队多年来一直在努力的方向。

$\alpha$ -GAL 虽然水解油茶蜂蜜中水苏糖, 棉子糖和甘露三糖, 产生大量半乳糖 (Li *et al.*, 2022), 但高浓度半乳糖仍然对蜜蜂幼虫和成虫有毒 (Peng, 1981)。显然半乳糖代谢通路中 GALK、GALT 和 GALE 3 种酶也极重要, 本研究首次克隆油茶地蜂  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 4 种酶基因并成功在大肠杆菌体内表达, 为规模化生物工程合成  $\alpha$ -GAL、GALK、GALT 和 GALE 4 种酶奠定了技术基础。本研究团队前期研究发

现, 3% 的  $\alpha$ -GAL 在体外消化 12 h 后, 对花蜜中甘露三糖、棉籽糖和水苏糖的消化率达到 80% 以上; 1 mg 的 GALK、GALT 和 GALE 在体外消化 48 h 后, 对半乳糖消化率达到 26.39% (李震, 2023; Li *et al.*, 2024)。本研究结果为破解蜜蜂访问油茶后中毒的“瓶颈”提供了新思路和方法, 为科学利用蜜蜂为油茶授粉提供了技术支撑。

## 参考文献 (References)

- Chen WX, Jiang HZ, Zeng ZJ, 2024. Research advances on major factor of honeybee cast differentiation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 61(6): 1177–1182. [陈伟轩, 江慧枝, 曾志将, 2024. 影响蜜蜂级型分化的主要因素研究进展. 应用昆虫学报, 61(6): 1177–1182.]
- Chen YZ, 2023. Scientific and technological progress and future core technologies of oil tea camellia in China. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 43(7): 1–22. [陈永忠, 2023. 我国油茶科技进步与未来核心技术. 中南林业科技大学学报, 43(7): 1–22.]
- Deng YY, Yu XL, Luo YB, 2010. The role of native bees on the reproductive success of *Camellia oleifera* in Hunan Province, Central South China. *Acta Ecologica Sinica*, 30(16): 4427–4436. [邓园艺, 喻勋林, 罗毅波, 2010. 传粉昆虫对我国中南地区油茶结实和结籽的作用. 生态学报, 30(16): 4427–4436.]
- Gao MZ, Wang JJ, Shi YY, Hou HW, 2020. Effects of  $\alpha$ -galactosidase on the growth performance, nutrient digestibility and intestinal flora of broilers. *Tianjin Agricultural Sciences*, 26(2): 58–61. [高木珍, 王俊菊, 史艳艳, 侯慧文, 2020.  $\alpha$ -半乳糖苷酶对肉鸡生产性能、表观消化率和肠道菌群的影响. 天津农业科学, 26(2): 58–61.]
- Huang DY, He B, Gu P, Su TJ, Zhu CD, 2017. Discussion on current situation and research direction of pollination insects of *Camellia oleifera*. *Journal of Environmental Entomology*, 39(1): 213–220. [黄敦元, 何波, 谷平, 苏田娟, 朱朝东, 2017. 油茶传粉昆虫研究现状与方向的探讨. 环境昆虫学报, 39(1): 213–220.]
- Jiang N, Tan XF, Xu Y, Zhou JQ, 2022. Identification and characteration of S-RNase gene (CoS-RNase) from *Camellia oleifera* Abel. *Journal of Plant Genetic Resources*, 23(5):

- 1521–1535. [江南, 谭晓风, 徐艳, 周俊琴, 2022. 油茶自交不亲和 S-RNase 基因鉴定与分子特征分析. 植物遗传资源学报, 23(5): 1521–1535.]
- Kang XD, Fan ZY, 1991. An analytical study of toxic substances in honey bee *Camellia oleifera* honey. *Journal of Bee*, 1991(1): 8–10. [康雪冬, 范正友, 1991. 蜜蜂油茶蜜中毒物质的分析研究. 蜜蜂杂志, 1991(1): 8–10.]
- Lei XP, Wang WF, Zhaluo, Zhang YL, Li Y, Zhuoga, Yao XB, Liu HC, Pang B, Cirenyangla, Wang CL, 2018. Study on pollination effect of Italian bees and bumblebees on greenhouse tomato. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(14): 72, 74. [雷雪萍, 王文峰, 扎罗, 张亚玲, 李杨, 卓嘎, 姚小波, 刘何春, 庞博, 次仁央拉, 王翠玲, 2018. 温室番茄意大利蜜蜂和熊蜂授粉效果研究. 现代农业科技, 2018(14): 72, 74.]
- Li SX, Gu YM, Tan GX, Yao YH, 2018. Effects of *Apis mellifera* pollination on yield and quality of blueberry. *Guizhou Agricultural Sciences*, 46(2): 99–101. [李上星, 顾燕梅, 谭光仙, 姚元海, 2018. 意大利蜜蜂授粉对蓝莓产量与品质的影响. 贵州农业科学, 46(2): 99–101.]
- Li Z, 2023. Analysis of the mechanism of toxicity by honey bee foraging on *Camellia oleifera* nectar and pollen. Doctor dissertation. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. [李震, 2023. 蜜蜂采集油茶蜜粉中毒机理解析. 博士学位论文. 南昌: 江西农业大学.]
- Li Z, Huang Q, Zheng Y, Zhang Y, Li X, Zhong S, Zeng Z, 2022. Identification of the toxic compounds in *Camellia oleifera* honey and pollen to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(41): 13176–13185.
- Li Z, Huang Q, Zhong SQ, Xu TY, Zeng ZJ, 2024. Construction of genome profile and comparative genome analysis of *Andrena camellia*. *Acta Entomologica Sinica*, 67(11): 1515–1524. [李震, 黄强, 钟史清, 徐天羽, 曾志将, 2024. 油茶地蜂基因组图谱的构建及比较基因组分析. 昆虫学报, 67(11): 1515–1524.]
- Li Z, Zhong SQ, Huang Q, Zhang Y, Xu TY, Shi WK, Guo DS, Zeng ZJ, 2024. The mechanism of *Andrena camellia* in digesting toxic sugars. *iScience*, 27(6): 109847.
- Liu JL, Yang Q, Li XJ, Wei Z, Zhu YD, Xue YL, Duan ZQ, Liu YY, 2023. Study on the quality characteristics of main varieties of oil-tea camellia seed oil in Hunan Province. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2023(8): 1–12. [刘佳丽, 杨茜, 李秀娟, 魏征, 朱莹丹, 薛雅琳, 段章群, 刘妍妍, 2023. 湖南省主要品种油茶籽油的营养品质研究. 中国粮油学, 2023(8): 1–12.]
- Ma WH, Shen JS, Wu WQ, Song HL, Li LX, Zhang RJ, Wei BG, Huang JX, 2021. Comparison of pollination effects between *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana* for soybean sterile lines. *Soybean Science*, 40(4): 522–527. [马卫华, 申晋山, 武文卿, 宋怀磊, 李立新, 张瑞军, 卫保国, 黄家兴, 2021. 意大利蜜蜂和中华蜜蜂对大豆不育系授粉效果的比较. 大豆科学, 40(4): 522–527.]
- Peng YS, 1981. Tolerance of lactose by free-flying adult worker honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 20(2): 89–93.
- Qiu JS, Zhang NN, Liu TT, Tian MJ, Xie ZH, Chen XM, 2018. Biological characteristics of pollination of *Andrena camellia* Wu. *Biotic Resources*, 40(2): 176–181. [邱建生, 张念念, 刘童童, 田茂娟, 谢正华, 陈晓鸣, 2018. 油茶地蜂的传粉生物学特性研究. 生物资源, 40(2): 176–181.]
- Wang Z, Zhu XM, 2023. Research progress of efficient planting and processing industry of *Camellia oleifera*. *Hubei Forestry Science and Technology*, 52(6): 55–60, 90. [王哲, 朱香明, 2023. 油茶高效种植及产业发展研究. 湖北林业科技, 52(6): 55–60, 90.]
- Xie Z, Chen X, Qiu J, 2013. Reproductive failure of *Camellia oleifera* in the plateau region of China due to a shortage of legitimate pollinators. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(3): 458–464.
- Xing KF, Xie HX, Zhang LD, Zhou J, Feng LY, Zhang HX, Chen S, Zhao Y, Rong J, Zhang J, 2024. Diversity analysis on fruit phenotype of wild *Camellia oleifera* from different provenances. *Journal of Plant Genetic Resources*, 25(7): 1106–1117. [邢凯峰, 谢昊星, 张立冬, 周军, 冯立云, 张华轩, 陈尚, 赵耀, 戎俊, 张剑, 2024. 不同种源野生油茶果实表型性状多样性分析. 植物遗传资源学报, 25(7): 1106–1117.]
- Zeng M, Zhou WL, Yan WY, Zeng ZJ, 2022. Developmental analysis of apicultural industry in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(6): 1471–1480. [曾蜜, 周伟良, 颜伟玉, 曾志将, 2022. 中国蜜蜂产业生产发展分析. 应用昆虫学报, 59(6): 1471–1480.]
- Zeng M, Zhou WL, Yan WY, Zeng ZJ, 2023. Analysis of honey export and import in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(3): 741–754. [曾蜜, 周伟良, 颜伟玉, 曾志将, 2023. 中国蜂蜜出口和进口分析. 应用昆虫学报, 60(3): 741–754.]
- Zeng M, Zhou WL, Yan WY, Zeng ZJ, 2024. Investigation of the current production status of different feeding methods of apiary. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 61(2): 485–491. [曾蜜, 周伟良, 颜伟玉, 曾志将, 2024. 不同饲养方式的蜂场生产现状调查与分析. 应用昆虫学报, 61(2): 485–491.]
- Zeng ZJ, 2020. Advances of honeybee biology in China in the past 70 years. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264.]
- Zhao SW, 1987. Successful large-scale promotion of *Camellia oleifera* bee pollination research results. *Journal of Bee*, 1987(6): 33. [赵尚武, 1987. 油茶蜜蜂授粉科研成果大面积推广成功. 蜜蜂杂志, 1987(6): 33.]
- Zhong XR, 2021. Research on the nutritional value and development of camellia oil. *China Food Industry*, 2021(22): 72–75, 128. [钟小荣, 2021. 山茶油营养价值和产业发展研究. 中国食品工业, 2021(22): 72–75, 128.]