

猪苓 II 型核糖体失活蛋白 A 链基因的克隆以及原核表达

刘蒙蒙^{1,2}, 邢咏梅¹, 郭顺星^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 江苏理工学院电气信息工程学院, 生物信息与医药工程研究所, 江苏 常州 213001)

摘要: 采用 RT-PCR 技术从中国野生猪苓菌核 (*Polyporus umbellatus*) 中克隆得到一个 II 型核糖体失活蛋白 (type II ribosome inactivating protein, RIP) A 链基因, 该基因 cDNA 包含的完整开放阅读框为 873 bp, 编码的氨基酸为 290 个, 分子质量为 32.33 kDa, 理论等电点为 5.58。氨基酸序列分析表明, 该基因编码的蛋白具有 RICIN 超家族蛋白的保守结构域。氨基酸序列多重比对及系统发育树结果显示, 猪苓 RIP 与硬柄小皮伞 (*Marasmius oreades*) 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析表明, 这个基因在不同的菌核部位都有表达, 且在蜜环菌感染的菌核部位表达显著上调, 提示该基因可能参与了猪苓响应生物胁迫过程。此外, 利用基因重组技术构建 pET15b-PuRIP 原核表达载体, 获得了高质量的 His-PuRIP 融合蛋白, 为多克隆抗体的制备提供材料基础, 为研究基因功能奠定基础。

关键词: 猪苓; II 型核糖体失活蛋白; 基因克隆; 表达分析; 蛋白表达与纯化

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0327-06

Molecular cloning and prokaryotic expression of a type II ribosome inactivating protein from *Polyporus umbellatus*

LIU Meng-meng^{1,2}, XING Yong-mei¹, GUO Shun-xin^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Institute of Bioinformatics and Medical Engineering, School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University of Technology, Changzhou 213001, China)

Abstract: A type II ribosome inactivating protein (RIP) gene was cloned from *Polyporus umbellatus* sclerotia by RT-PCR method. The full open reading frame cDNA sequence of this gene was 873 bp in length and encoded a 290-aa protein with a molecular weight of 32.33 kDa and an isoelectric point of 5.58. Multiple sequence alignment revealed that the deduced amino acids possessed conserved domains of RICIN superfamily protein. A neighbor joining phylogenetic analysis suggests that PuRIP was closely related to RIP in *Marasmius oreades*. Real time PCR results showed that this gene expressed in all tested tissues of *P. umbellatus*. Meanwhile, the expression of this gene was significantly up-regulated in the part infected by *Armillaria mellea*. This result suggested that this PuRIP might played important role with potential biotic stress tolerance of *P. umbellatus*. Otherwise, we successfully constructed the pET15b-PuRIP plasmid, produced and purified the His-PuRIP fusion protein, which would provide the basic material for polyclonal antibody preparation and gene function research.

Key words: *Polyporus umbellatus*; type II ribosome inactivating protein; gene clone; expression analysis; protein expression and purification

收稿日期: 2016-07-25; 修回日期: 2016-10-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201666); 2014 年度山西省煤基重点科技攻关项目 (FT2014-03); 河北山区特色中药材种质资源评价与仿野生栽培技术研究示范 (16232503).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-62829619, E-mail: sxguo1986@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0731

凝集素 (lectin) 一般是指从各种植物、动物中提取出来能够凝集细胞或沉降复合糖质, 非免疫起源的蛋白质或糖蛋白, 很少具有酶活性^[1]。食 (药) 用真菌中的凝集素主要分布在真菌的菌丝体、菌核、菌盖和菌柄中^[2], 凝集素可能在大型真菌的休眠、生长和形态发生中发生变化, 凝集素可能在大型真菌受寄生感染后的形态改变过程中行使一定的功能^[3]。目前, 大型真菌的凝集素主要应用于真菌的分类学、胚胎学以及细菌学研究^[4]。

根据蛋白氨基酸序列的同源性及其在进化上的关系, 可以将凝集素分为 7 个家族。其中一个家族为 II 型核糖体失活蛋白 (RIP), 即 II 型 RIPs, 由两条链组成: A 链 (RTA) 和 B 链 (RTB), 其中 A 链结构类似于 I 型 RIPs, 具有一般的酶活性, 蛋白的分子质量较大, 约 35 kDa 左右; B 链对半乳糖结构具有特定的凝集素活性^[5]。目前所有的研究表明, 已发现的 I 型 RIPs 对真菌、动物病毒都具有抗菌活性^[6], 而仅有部分 II 型 RIPs 表现出此性质。

食 (药) 用真菌中分布着大量的凝集素, 猪苓菌核隶属于多孔菌科的大型真菌, 是我国最重要的药用真菌资源之一, 其生长发育必须依赖蜜环菌提供营养物质; 在猪苓与蜜环菌形成共生关系的过程中, 蜜环菌菌索会侵入猪苓菌核, 诱发猪苓菌核的防御反应。II 型 RIPs 作为凝集素家族的一个成员, 探明其在猪苓防御体系中的作用机制是十分重要的。

在本课题组前期构建的猪苓菌核转录组文库中发现 1 个差异表达的凝集素蛋白家族基因 (II 型核糖体失活蛋白 A 链基因) 的全长开放阅读框 (ORF)。本研究中利用 RT-PCR 技术克隆得到猪苓菌核中该基因的开放阅读框全长序列, 并就该基因的结构特征和功能进行初步分析, 对该基因在蜜环菌侵染后的转录模式进行了检测, 并构建了猪苓 *PuRIP* 基因原核表达载体, 进行了重组蛋白的表达与纯化, 为制备多克隆抗体提供了材料, 以期为进一步揭示 II 型核糖体失活蛋白的功能以及探讨猪苓的防御分子机制奠定基础。

材料与方法

猪苓 猪苓菌核于 2014 年 8 月采自山西古县党家山村。

总 RNA 提取及 cDNA 合成 根据天根生化科技 (北京) 有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 利用 1.2% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, 使用分光光度计 NanoDrop 2000 (Thermo Scien-

tific, 美国) 测定 RNA 浓度。应用 M-MLV Reverse Transcriptase kit (艾德莱, 中国) 反转录合成猪苓 cDNA 第一链并存储于 -20 °C 保存备用。

基因的克隆 在本课题组已测得的猪苓转录组数据库中找到 1 个编码 RIP A 链蛋白的全长基因 unigene 序列, 利用 primer 3 在线软件分别从起始密码子与终止密码子开始设计 1 对引物: PuRIPP1 5'-ATG ACT CTT TCT CGC GGA AT -3', PuRIPP2 5'-TCA GAA GTA GGC AAG GTA G -3', 用 RT-PCR 来获取 *RIP* 基因的全长开放阅读框。以猪苓 cDNA 为模板进行 PCR, 总反应体系为 25 μ L, 包括: 0.5 μ L dNTPs (10 mmol·L⁻¹), 1 μ L cDNA、12.5 μ L Phanta Max buffer、0.5 μ L Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、引物各 1 μ L (10 mmol·L⁻¹) 和 8.5 μ L ddH₂O。扩增反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。将获得的条带通过 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.4.0 割胶回收纯化, 与 pMD18-T Vector 连接后转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落进行培养, 由苏州金唯智公司进行序列测定。获得测序结果后通过 GenBank 进行 BLAST 搜索比对。

生物信息学分析 利用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行开放阅读框预测, 氨基酸序列在 NCBI 的保守域数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 进行分析以寻找其保守域。利用 Blast 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 对该基因进行序列同源性比对, 利用 ExPASy 的 ProtParam 工具 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行蛋白质理化性质 (等电点、分子量) 分析, 采用 DNASTAR 6.0 进行氨基酸序列比对分析; 借助 MEGA 6.0 构建系统进化树。

实时荧光定量 PCR 分析 利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *RIP* A 链基因的表达模式, 利用 primer 5 软件设计引物: qPuRIPP1 5'- CCT CAC CTC AGC ACA CAG TA-3', qPuRIPP2 5'- ATT TCT CCG CTC CCC ATT CA-3', 用猪苓 β -tublin 基因作为内参基因。分别取被蜜环菌侵染的菌核 (CT) 以及未被蜜环菌侵染的菌核 (CK), 提取 RNA 后用 M-MLV Reverse Transcriptase kit (艾德莱, 中国) 反转录获得 cDNA, 用 Roche LightCycler[®] 480 II 对目的基因的转录水平进行检测。使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (艾德莱, 中国) 进行 qPCR 反应, 反应体系为 15 μ L, 其

中包括 7.5 μL 2 \times SYBR[®] Premix ExTaq[™] Master Mix、0.5 μL 引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、2 μL cDNA 模板以及 4.5 μL ddH₂O。反应程序设定如下: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 32 s, 40 个循环, 同时绘制熔解曲线。每个反应重复 3 次, 实验重复 3 次。

原核表达载体 pET-15b-RIP 的构建 以稀释 100 倍的 RIP 基因的 pMD18-T 质粒为模板, 用以下引物进行 PCR 扩增, 5'-GGT TCC GCG GGA TCC ATG ACT CTT TCT CGC GGA AT -3', P2: 5'-GCG CGC TCG CAT ATG TCA GAA GTA GGC AAG GTA G -3', 划线部分为与 pET15b 相同的同源臂。PCR 反应体系如下: 10 \times Buffer 2.5 μL 、MgCl₂ (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL 、dNTP (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、引物 1 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、引物 2 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、质粒 0.5 μL 、DNA polymerase 0.5 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 30 循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的条带。pET15b 载体质粒分别用 *Bam*HI 和 *Nde*I 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, 在 PCR 离心管中分别加入: pET-15b 酶切回收片段 100 ng; 5 \times In-Fusion HD Enzyme 2.0 μL ; 纯化的 RIP 基因片段 50 ng。瞬时离心, 在 PCR 仪中 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 然后置于冰上。转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 随机挑选克隆, 提取质粒, 送北京金唯智公司进行测序。阅读框正确的质粒即为融合表达载体 pET-15b-RIP。

PuRIP 蛋白的原核表达 将含有重组质粒 pET-15b-RIP 的 *E. coli* BL21 (DE3) 阳性克隆振荡培养过夜, 菌液以 1:100 比例稀释于含有 Amp (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ \approx 0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 转入 15 $^{\circ}\text{C}$ 摇床以 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h, 离心收集菌体。

重组蛋白的纯化 冰水浴超声破碎菌体, 收集上清液。利用 Ni-NTA His-band Colum 纯化蛋白, 用 10 倍柱体积的 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑平衡 Ni-NTA His-band Colum, 将裂解上清液上柱、淋洗, 上样完毕后, 依次用 10 倍柱体积的咪唑 (10、20、50、80 和 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 过柱洗去杂蛋白。用 3 倍柱体积的 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱目的蛋白, 收集至 2 mL 离心管中。利用 SDS-PAGE 电泳及后续的 Western blotting 分析蛋白的纯度。

Western blotting 鉴定表达蛋白 按照 Western blotting 方法, 将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,

200 mA 恒流转移 2 h 到 PVDF 膜上, 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 5% 的脱脂牛奶 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温封闭 4 h, 用鼠源的 His 单克隆抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 鼠二抗 (1:1000) 室温孵育 1 h 后, 用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 显色, 化学发光成像仪 (Bio-Rad Gel Doc XR+) 成像, 并保存。

结果

1 猪苓 RIP 基因的克隆

以未被蜜环菌侵染的猪苓菌核的 cDNA 为模板, 利用上文中的引物通过 RT-PCR 方法获得猪苓的 RIP 基因片段, 目的片段经回收、克隆、测序后, 分离得到猪苓 RIP 基因完整的 ORF 序列 (图 1)。与转录组中拼接的序列进行比对后, 发现其与文库中的 unigene 序列的 ORF 序列一致, 因此可以证明已成功获得 RIP 基因的全长 ORF。BLAST 分析表明其为 RIP 家族基因的同源基因。

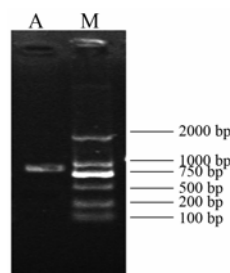


Figure 1 PCR product of RIP protein gene. A: RIP gene; M: DL2000

2 猪苓 RIP 蛋白基因序列分析

ProtParam 程序预测 RIP 基因编码氨基酸序列分子质量为 32.33 kDa, 理论 pI 值为 5.58。推测该蛋白质分子式为 C₁₄₅₇H₂₁₆₅N₃₇₉O₄₃₅S₁₂。核苷酸序列比对结果表明, 该基因核苷酸编码的氨基酸序列与硬柄小皮伞 (*Marasmius oreades*) 同源率为 52%, 与宽鳞多孔菌 (*Polyporus squamosus*) 同源率为 45%; 将推测的氨基酸序列提交到 NCBI 的保守域数据库 (Conserved Domain Database, CDD) 进行搜索, 结果如图 2 所示, 该基因的核苷酸序列具有 RICIN 超家族蛋白的保守结构域。推测克隆的该基因为猪苓菌核的 RIP 基因。NCBI 登陆号为: KU179190, 用 SignalP 4.1 Server 检测发现该蛋白无信号肽区域 (图 3)。用 TMHMM 2.0 分析发现该蛋白并无跨膜区域, 但是该蛋白定位于细胞膜外, 属于胞外蛋白 (图 4)。

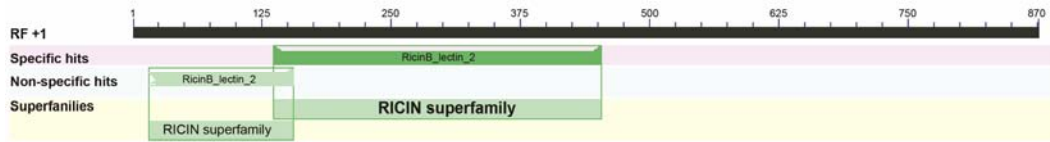


Figure 2 Conserved protein domains of RIP protein

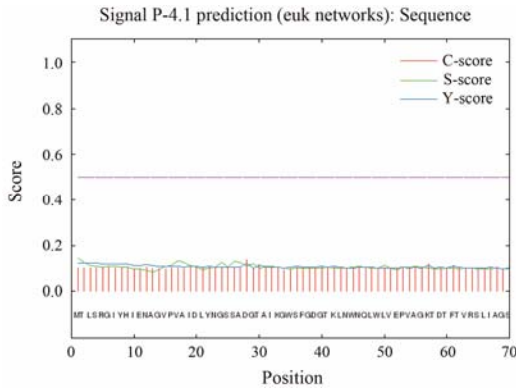


Figure 3 Signal peptide analysis of the RIP

3 猪苓 RIP 蛋白多序列比对及系统发育树分析

利用 DNASTAR 6.0 软件将此基因编码的蛋白序列与其他真菌 RIP 蛋白序列进行比对表明, 猪苓中的凝集素蛋白基因与其他真菌中的 RIP 蛋白具有很高的相似度 (图 5)。

为了研究 RIP 基因编码蛋白的分子进化关系, 根据猪苓凝集素推导的氨基酸序列及其他真菌凝集素的氨基酸序列构建了系统进化树, 所用的软件是

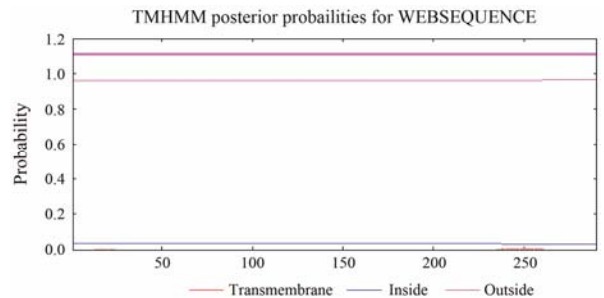


Figure 4 The transmembrane domain of RIP analysis by TMHMM

ClusterX 2.0 及 MEGA 6.0。结果如图 6 所示, 所建的系统进化树主要分为两大分支, 所分离得到的猪苓 RIP 蛋白与硬柄小皮伞 (*Marasmius oreades*) RIP 蛋白亲缘关系最近。污叉丝孔菌 (*Dichomitus squalens*) RIP 蛋白作为外类群。

4 猪苓 RIP 蛋白基因表达模式分析

通过实时定量 PCR 检测 RIP 基因在不同猪苓菌核部位的转录水平。结果表明, RIP 基因在未被蜜环菌感染及被蜜环菌感染的猪苓菌核部位均有表达。荧

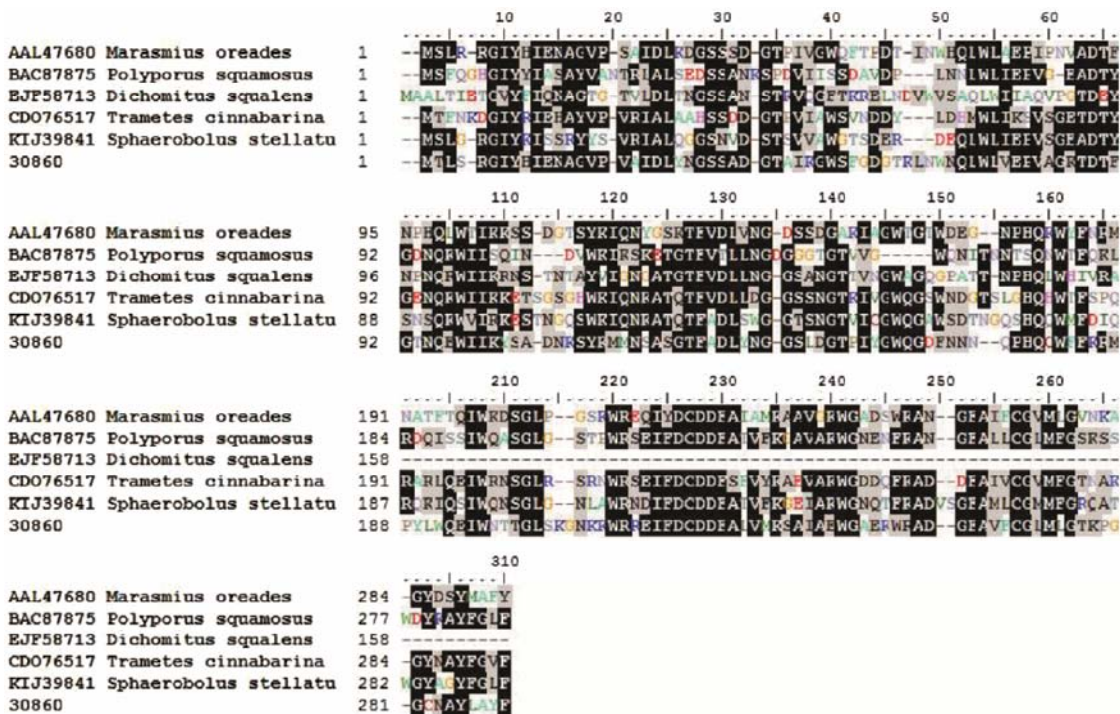


Figure 5 Multiple sequence alignment of RIP and RIP proteins from other fungi. The amino acids in the dark were the same

光定量 PCR 结果表明, 该基因在被蜜环菌侵染部位的表达量要显著高于未被蜜环侵染的猪苓菌核, 为未被侵染部分的 17.96 倍 (图 7)。

5 重组蛋白的诱导表达及纯化

将表达载体 pET15b 转入 BL21 (DE3) 中作为对照, 同时诱导含有 pET15b-RIP 和 pET15b 的 BL21 (DE3)。在 15 °C 摇床中以 200 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h 后, 收集菌体, 菌体超声破碎后, 分别收集上清液和沉淀, 经 10% SDS-PAGE 电泳分析。如图 8 所示, 含 pET15b 空载体的质粒无特异蛋白出现, 含有重组质

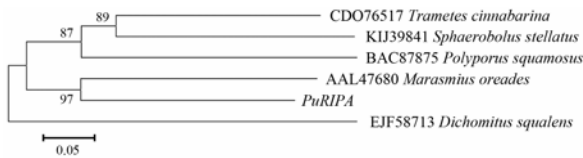


Figure 6 Phylogenetic relationship of RIP in different fungal species. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence

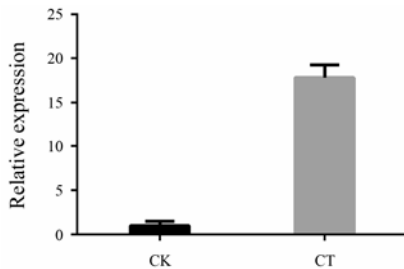


Figure 7 qRT-PCR analysis of the RIP protein expression. CK: Controlled medullar tissue; CT: Treated medullar tissue

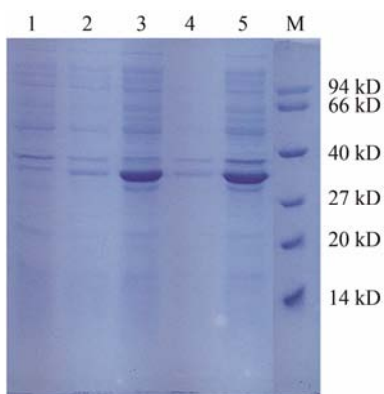


Figure 8 Expression profile analysis of His-PuRIPA fusion protein by SDS-PAGE. M: Low molecular protein maker; 1: *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET-15b; 2: None IPTG-induced *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET15b-RIP-vector; 3: The soluble expressed proteins of pET15b-RIP-vector induced with 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 24 h at 15 °C; 4: Insoluble expressed proteins of pET15b-RIP-vector induced with 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 24 h at 15 °C; 5: The total expressed proteins of pET15b-RIP-vector induced with 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 24 h at 15 °C

粒 pET15b-RIP 的菌体经 IPTG 诱导后, 在 32 kDa 处出现 1 条特异蛋白条带。而且, 在菌体沉淀中几乎看不到特异蛋白的出现, 说明所表达的蛋白几乎都存在于上清液中。

重组工程菌经诱导表达, 超声破碎菌体后收集上清液, 上清液经 Ni-NTA His-band Colum 纯化后, 纯化后的 His-PuRIPA 融合蛋白, 待使用 Western blotting 方法检测。

6 重组蛋白的鉴定

为了更准确鉴定所纯化的蛋白是 His-PuRIPA 的融合蛋白, 利用 His 标签蛋白的相应抗体进行检测。经检测证实该融合蛋白可与 His 单克隆抗体发生特异性结合, 结果如图 9 所示。大约在 32 kDa 位置有清晰的目的条带。同时, 在 Western blotting 的结果中出现了许多非特异性条带, 可能是由于二抗试剂的非特异结合所造成的结果。

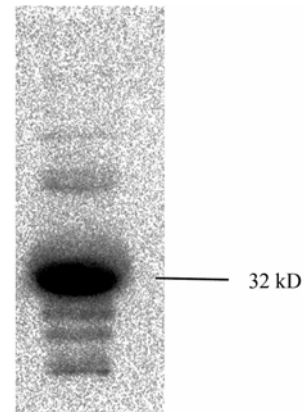


Figure 9 His-PuRIPA fusion protein verification by Western blotting. His-PuRIPA fusion protein marked with 32 kDa

讨论

凝集素蛋白起源古老, 在漫长的进化史中, 编码类凝集素的基因不断发生基因复制事件^[7]。因此, 凝集素具有多种生物学功能。本研究从野生猪苓菌核中克隆到 RIP A 链基因, 并对该基因的序列和表达模式进行了比较详细的研究。

本研究利用 RT-PCR 技术, 扩增得到了猪苓菌核 II 型核糖体失活蛋白 (RIP) A 链基因的全长序列。经与 NCBI 数据库进行 BlastX 分析, 它与硬柄小皮伞 (*Marasmius oreades*)、宽鳞多孔菌 (*Polyporus squamosus*) 同源性分别为 52% 和 45%。

猪苓 II 型核糖体失活蛋白由 290 个氨基酸残基组成, 其不具有信号肽及跨膜结构, 其分子量大小为 32.33 kDa, 与之前文献^[8]报道的 II 型核糖体失活蛋白的性质一致。

II型核糖体失活蛋白在植物中研究较多,有研究对蓖麻的全基因组数据组进行搜索,结果发现其基因组中含有7个II型RIP基因^[9]。通过搜索水稻的全基因组发现水稻的基因组中含有31个I型RIP基因^[10]。不同RIP基因家族中的基因,其表达常常表现出组织特异性和发育阶段的特异性,并且可应答不同的胁迫环境,参与植物体的抗逆境过程。有研究表明,假眼小绿叶蝉取食茶树的过程中,可以诱导其II型RIP基因的表达,并且随着取食时间的延长,RIP基因的表达量逐渐增加^[11]。烟草在生长过程中常常受到草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的侵染,但将麻疯树中叶子中的新型RIPs在烟草中过表达后,可以有效增加烟草对TMV、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)的抗性,减少TMV和其他真菌对其的侵染^[12]。本研究利用定量qPCR技术检测猪苓II型核糖体失活蛋白基因在猪苓经蜜环菌侵染后表达趋势。结果显示:在蜜环菌侵染时的猪苓菌核中,II型核糖体失活蛋白基因表达量都呈现很高趋势,显著大于未被蜜环菌侵染的猪苓菌核。说明蜜环菌侵染造成的机械伤害显著诱导RIP基因的表达,提示该基因可能参与了猪苓防御过程。此外,高质量His-PuRIP融合蛋白的获得,为今后PuRIP多克隆抗体制备提供了科学依据;II型核糖体失活蛋白基因的克隆与表达分析以及蛋白的获得,不仅为猪苓凝集素基因家族增添了新成员,而且为进一步研究II型核糖体失活蛋白基因在猪苓抗逆中的作用奠定了基础。

References

- [1] Sommer R, Exner TE, Titz A. A biophysical study with carbohydrate derivatives explains the molecular basis of monosaccharide selectivity of the *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecB [J]. PLoS One, 2014, 9: e112822.
- [2] Wohlschlagel T, Butschli A, Grassi P, et al. Methylated glycans as conserved targets of animal and fungal innate defense [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111: E2787–E2796.
- [3] Huysamen C, Brown GD. The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 290: 121–128.
- [4] Khan F, Khan MI. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives [J]. Int J Biol Chem, 2011, 5: 1–20.
- [5] Mundy J, Leah R, Boston R, et al. Genes encoding ribosome-inactivating proteins [J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: S60–S62.
- [6] Parikh BA, Tumer NE. Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine [J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4: 523–543.
- [7] Virgilio MD, Lombardi A, Caliendo R, et al. Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack [J]. Toxins, 2010, 2: 2699–2737.
- [8] Sharma N, Park SW, Vepachedu R, et al. Isolation and characterization of an RIP (ribosome-inactivating protein)-like protein from tobacco with dual enzymatic activity [J]. Plant Physiol, 2004, 134: 171–181.
- [9] Leshin J, Danielsen M, Credle JJ, et al. Characterization of ricin toxin family members from *Ricinus communis* [J]. Toxicon, 2010, 55: 658–661.
- [10] Jiang SY, Ramamoorthy R, Bhalla R, et al. Genome-wide survey of the RIP domain family in *Oryza sativa* and their expression profiles under various abiotic and biotic stresses [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67: 603–614.
- [11] Yuan HY, Ma N, Yang HM, et al. Cloning and expression of II type ribosome inactivating protein genes CsRIP1 and CsRIP2 from *Camellia sinensis* [J]. Sci Sil Sin (林业科学), 2015, 51: 147–153.
- [12] Huang MX, Hou P, Wei Q, et al. A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco [J]. Plant Growth Regul, 2008, 54: 115–123.