

99, 2(2)

21-26

天麻抗真菌蛋白 GAFF - I 的一级结构和 cDNA 克隆*

胡忠 黄清藻 刘小烛 杨俊波

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 天麻抗真菌蛋白 GAFF - I 是从天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 顶生球茎分离的 14kD 蛋白, 它能强烈抑制腐生真菌菌丝的生长, 在天麻限制和防止密环菌 (*Armillaria mellea*) 侵染球茎的防卫机制中起重要作用。本文报告 GAFF - I 的一级结构和 cDNA 克隆的核苷酸序列。首先测得 N - 末端 7 个氨基酸序列为 SDRLNSG - 用以合成一个简并引物, 由天麻营养球茎提取 RNA, 通过 3' - RACE 技术扩增到一个 600 bp 的 cDNA 片段, 直接克隆到 pGE - T 载体中测定核苷酸序列。根据 cDNA 核苷酸序列和用羧肽酶 A 测得 GAFF - I 的 C - 末端为 - ASG, 确认该 cDNA 含有 429 bp 编码区, 它编码一条 129 个氨基酸的 GAFF - I 和 14 个氨基酸的 C - 末端扩展肽。同时, 分离和纯化 GAFF - I 经过羟胺裂解和 α - 糜胰蛋白酶消化产生的肽段, 经自动 Edman 降解程序测出它们的氨基酸序列。结果表明, 由此测出的 GAFF - I 氨基酸序列和由 cDNA 核苷酸序列推导出的序列 98.4% 一致。GAFF - I 由 129 个氨基酸组成, 富含 Asn (19)、Gly (14), 29 和 52 位间有一对双硫键, 计算分子量为 13958 Da。GAFF - I 与雪花莲 (*Galanthus nivalis* L.) 凝集素 LECGNA 2 的氨基酸序列有很高的相似性, 该凝集素 105 个氨基酸全序列与 GAFF - I 相应序列之间相同和相匹配氨基酸达 65%, 包括一对定位相同的双硫键。编码 GAFF - I 的 cDNA 核苷酸序列已发 GenBank 数据库; accession number AF123309。

关键词 天麻, 抗真菌蛋白 GAFF - I, 蛋白质一级结构, cDNA 克隆, 羟胺裂解

分类号 Q943 5567.239

Primary Structure and cDNA Cloning of the Antifungal Protein GAFF - I from *Gastrodia elata*

HU Zhong, HUANG Qing - Zao, LIU Xiao - Zhu, YANG Jun - Bo

(Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Science, Kunming 650204)

Abstract The *Gastrodia* Antifungal Protein GAFF - I was purified from topical corm of Tian Ma (*Gastrodia elata*), which can strongly inhibit the mycelia growth of saprophytic fungi and plays an important role in the defence mechanism of plants to restrict and prevent the infection of the fungus *Armillaria mellea*. This paper reports the primary structure and the cDNA nucleotide sequence of GAFF - I. The N - terminal 7 amino acid sequence to be SDRLNSG - was determined by automatic sequencer and used for synthesizing a degenerated primer. The mRNA from the *Gastrodia* corm was amplified to be a specific cDNA of about 600 bp through a 3' - RACE experiment with the degenerated primer. The cDNA was directly cloned into pGEM - T vectors and sequenced. The nucleotide sequence of cDNA and C - terminal amino acid sequence to be - ASG of

* 国家自然科学基金资助项目 (39570161)
1998 - 12 - 21 收稿, 1999 - 03 - 01 接受发表

GAFP-I determined with carboxypeptidase A indicate that the cDNA contains a 429 bp region encoding GAFP-I of 129 aa and a C-terminal extending peptide of 14 aa. Furthermore, peptides were separated and purified from hydroxylamine cleaved and α -chymotrypsin digested GAFP-I, and sequenced by automatic Edman degradation. The determined aa sequence was found to be 98.4% identical to the one deduced from nucleotide sequence of the cDNA. GAFP-I is a single polypeptide of 129 aa, rich in Asn (19) and Gly (14), with a disulfide bridge between the 29th and 52th aa and a calculated Wt of 13958 Da. A high aa sequence similarity was found between GAFP-I and the snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin LECGNA 2, the match of aa was 65%, including an identically located disulfide bridge. The nucleotide sequence of cDNA encoding GAFP-I has been submitted to GenBank database under an accession number AF123309.

Key words *Gastrodia elata*, Antifungal protein GAFP-I, cDNA cloning, Hydroxylamine cleavage

天麻 (*Gastrodia elata*) 是一种特殊营养型的兰科植物, 与密环菌 (*Armillaria mellea*) 密切相关。天麻依靠入侵于营养球茎中的菌丝得到营养物供顶生球茎生长发育。我们证明 (胡忠等, 1988, 1994), 在密环菌侵染诱导下, 球茎大量合成一种 14kD 蛋白质, 称为天麻抗真菌蛋白 (GAFP), 积累于顶生球茎的表皮和皮层, 由于它能强烈抑制腐生性真菌生长, 从而阻止密环菌侵染顶生球茎, 使其得以正常生长。本文首次报告 GAFP-I 的一级结构及其 cDNA 克隆的核苷酸序列。鉴于用常规程序测定 GAFP-I 的氨基酸全序列很困难, 我们首先测定 N-末端部分氨基酸序列, 据以合成一个简并引物, 利用 3'-RACE 技术从 RNA 扩增到包含 GAFP-I 编码区的 cDNA 片段, 克隆并测序。由 cDNA 的核苷酸序列推出 GAFP-I 的氨基酸序列, 在此引导下, 对 GAFP-I 进行裂解和酶解, 用自动 Edman 降解程序测定各纯化的肽段氨基酸序列, 建立 GAFP-I 的一级结构。

1 材料和方法

1.1 蛋白质样品的制备

收集人工栽培正在生长中的天麻顶生球茎, 洗净后置 -20℃ 备用。提取 GAFP-I 的方法见胡忠等 (1988)。制备的 GAFP-I 再用 S-Hyper D10 柱 (Beckman 公司) 进行高效阳离子交换层析纯化, SDS-PAGE 检测为 14kD 单一带。

1.2 蛋白质变性

热变性。GAFP-I 溶于 7 mol/L 盐酸胍溶液 (pH7.5), 沸水浴中加热 10 min, 置 1kD 透析袋中对 0.05 mol/L 碳酸氢铵透析, 收集蛋白质沉淀, 蒸馏水洗涤后备用。

三氯乙酸 (TCA) 变性。5 mg/mL 的 GAFP-I 溶液于冰浴中加入 50% 的 TCA 至其浓度为 10%, 离心得蛋白质沉淀, 蒸馏水洗涤后备用。

1.3 蛋白质 N-末端和 C-末端氨基酸的测定

热变性 GAFP-I 溶于 0.1 mol/L 乙酸, 于 ABI-476A 氨基酸序列仪测得 N-末端 12 个氨基酸序列。鉴于上述方法解出的 N-末端氨基酸不确定, 另用常规 Dansyl-Cl 荧光标记和聚丙烯酰胺薄膜层析法对 TCA 变性蛋白质样品的 N-末端进行测定和验证。

C-末端用羧肽酶 A (B.M 公司产品) 按常规方法测定 (徐秀璋, 1988)。TCA 变性蛋白悬

于 0.1 mol/L 甲基吗啉乙酸缓冲液 (pH8.1), 5 mg/mL, 37°C, 加入 0.1 mg 酶后于 0、5、30、80 min 各取出 0.2 mL, 离心去沉淀, 冻干, 用氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成和含量。

1.4 肽段的制备和测序

羟胺裂解法。按 Bornsfein *et al* (1977) 方法操作, 反应产物过 Biogel 2 凝胶柱脱盐, 第一洗脱峰为沉淀物, 冻干后用 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分离, 蛋白带按 ABI-476A 氨基酸序列仪所附方法转移到膜上进行序列测定。第二个肽洗脱峰冻干, 经 Rp-HPLC 纯化后测序。

α -糜乳胰蛋白酶和胰蛋白酶酶解按常规方法操作 (徐秀璋, 1988)。热变性 GAFP-I 悬于 1% 的碳酸氢铵溶液 (pH8.0), 加 1/50 量的酶, 37°C 酶解 2~4 h, 离心去沉淀, 上清液冻干。酶解产物经反相高效液相色谱分离纯化, 也用高效离子交换色谱分离纯化, 收集主要肽峰, 冻干后测定氨基酸序列或测定氨基酸组成。

1.5 RNA 分离和 cDNA 第一链合成

取生长中天麻的营养茎洗净后于液氮中粉碎, 置 -70°C 备用。按 Jones *et al* (1985) 方法制备总 RNA。从 50 g 鲜球茎得 4mg RNA。

以 RNA 为模板合成第一链 cDNA (GIBCO BRL 公司试剂盒)。引物为 (dT) 17-adaptor, adaptor 为 5'-CCG CAA TTC TAG ACC TCG AG-3'。

1.6 PCR 扩增和 cDNA 的克隆

按 GAFP-I 的 N-末端 7 个氨基酸的序列合成含次黄苷 (I) 的简并引物 G1N1: WSI GAY MGI YTI AAY WSI CG, 以上述 adaptor 为配对引物, 以第一链 cDNA 为模板作 PCR 反应。反应条件为 95°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 35 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示一条 600 bp 产物。该产物回收后直接克隆到 pGM-T 载体系统 (Promega 公司产品), 转化大肠杆菌 DH5a, 在 X-gal 平板上筛选出重组质粒, 送交 Takara Biotech 公司测序, 克隆编号 pG1N1。

根据上述克隆测序结果, 根据其 222-242 位核苷酸序列合成一条特异的引物 G1N2: CCG CAA AAC GGT AAC TAC TA, 以 adaptor 为配对引物同前进行 PCR 反应, 得到一条 360bp 扩增产物, 克隆并测序, 克隆编号 pG1N2。设置 pG1N2 重叠是为了提高 cDNA 核苷酸序列特别是其 3'-端核苷酸序列测定的可靠性。

2 结果

2.1 GAFP-I 氨端和羧端的氨基酸序列

用自动氨基酸序列仪测得 GAFP-I 氨端 12 个氨基酸残基的序列为: S (A) D R L N S G H Q L D T。Edman 降解产生的 N-端第一个氨基酸除出现 PTH-Ser 外, 还有 PTH-Ala。为了验证是否有 2 个 N-末端, 利用了 Dansyl-Cl 标记末端测定法, 在 Dansyl-Cl 试剂与样品耦合后, 在酸性条件下用乙酸乙脂抽提除去 Dansyl 标记的游离氨基酸, 再将 Dansyl 标记的蛋白质水解, 确认 GAFP-I 的 N-末端只是 Ser。

用羧肽酶 A 酶切 GAFP-I, 由氨基酸的释放 (图 1) 证明 C 端的氨基酸序列为 -Ala -Ser -Gly。

2.2 cDNA 克隆的核苷酸序列

用引物 G1N1 和 G1N2 通过 3' - RACE 分别扩增到 600 bp 的 cDNA 片段 (图 2) 和 360 bp 的 cDNA 片段。由此分别得到克隆 pG1N1 和 pG1N2。克隆 pG1N1 的核苷酸序列见图 3。克隆 pG1N2 的核苷酸序列与图 3 的第 222 位以后的序列完全重叠。由图 3 序列可知, 它包含一个 429 bp 的编码区, 编码一条 143 个氨基酸残基的多肽链。根据 GAFF - I 的 C 末端序列可知, 该多肽链包含 129 个氨基酸的 GAFF - I 和 14 个氨基酸的 C - 末端扩展肽。

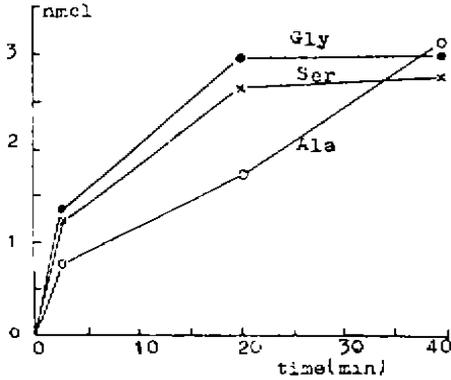


图 1 用羧肽酶 A 消化 GAFF - I 自 C - 末端释放出氨基酸的动态。可见 C 端氨基酸序列为 - Ala - Ser - Gly。
Fig.1 Amino acids released from C - terminus of GAFF - I digested by carboxypeptidase A. The C - terminal sequence is - Ala - Ser - Gly.

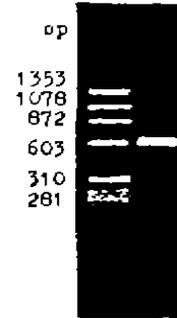


图 2 利用引物 G1N1 通过 3' - RACE 扩增 GAFF - I 的第一链 cDNA 得到一条 600 bp 的 PCR 产物。分子量标记 X174/HaeIII。
Fig.2 A PCR amplified product of 600 bp from 1st strand cDNA of GAFF - I by 3' - RACE with primer G1N1. DNA Wt. marker is X 174/HaeIII.

```

1   AGG GAT CGG TTG AAT TCG GGC CAC CAA CTT GAT ACC GGG GGC TCA CTA GCA CAA
   R  D  R  L  N  S  G  H  Q  L  D  T  G  G  S  L  A  Q
55  GGC GGC TAC CTA TTC ATA ATA CAA AAC GAT TGT AAT CTT GTC TTA TAT GAT AAC
   G  G  Y  L  F  I  I  Q  N  D  C  N  L  V  L  Y  D  N
109 AAC AGA GCG GTC TGG GCA TCA GGA ACC AAC GGA AAG GCC TCT GGC TGC GTG CTT
   N  R  A  V  W  A  S  G  T  N  G  K  A  S  G  C  V  L
163 AAG ATG CAG AAT GAT GGC AAC CTC GTT ATT TAT AGC GGT AGC AGG GCA ATA TGG
   K  M  Q  N  D  G  N  L  V  I  Y  S  G  S  R  A  I  W
217 GCA AGC AAC ACC AAT CGC CAA AAC GGT AAC TAC TAT CTG ATC CTT CAG AGA GAT
   A  S  N  T  N  R  Q  N  G  N  Y  Y  L  I  L  Q  R  D
271 CGT AAC GTC GTC ATA TAC GAT AAT TCT AAT AAT GCG ATT TGG GCA ACC CAC ACC
   R  N  V  V  I  Y  D  N  S  N  N  A  I  W  A  T  H  T
325 AAC GTT GGA AAT GCT GAA ATC ACT GTC ATC CCA CAC AGC AAC GGC ACA GCG GCG
   N  V  G  N  A  E  I  T  V  I  P  H  S  N  G  T  A  A
379 GCG TCT GGC GCA GCA CAG AAC AAG GTC AAT GAA TTA TAC ATA TCC ATG TAC TAG
   A  S  G  I  A  A  Q  N  K  V  N  E  L  Y  I  S  M  Y  *
433 CGGTCTAAGAGAATAGCTAGCTAGCTATGCGCGCATGCGTCTGTTCTCTGTGCGTGCACAAGAATAAATC
505 TGTTGAGGTGTTGGGATGTTTCATATTAATAAATTAAGCTGCTTCTAAAAA
    
```

图 3 GAFF - I 的 cDNA 克隆 pG1N1 的核苷酸序列和由编码区核苷酸序列推导出的氨基酸序列。* 指示终止密码, 箭头指示 C - 末端切割位点。
Fig.3 The nucleotide sequence of the cDNA clone pG1N1 and the amino acid sequene deduced from the codes of encoding region. * indicates the stop code and an arrow indicates the cleavage site at C - terminus.

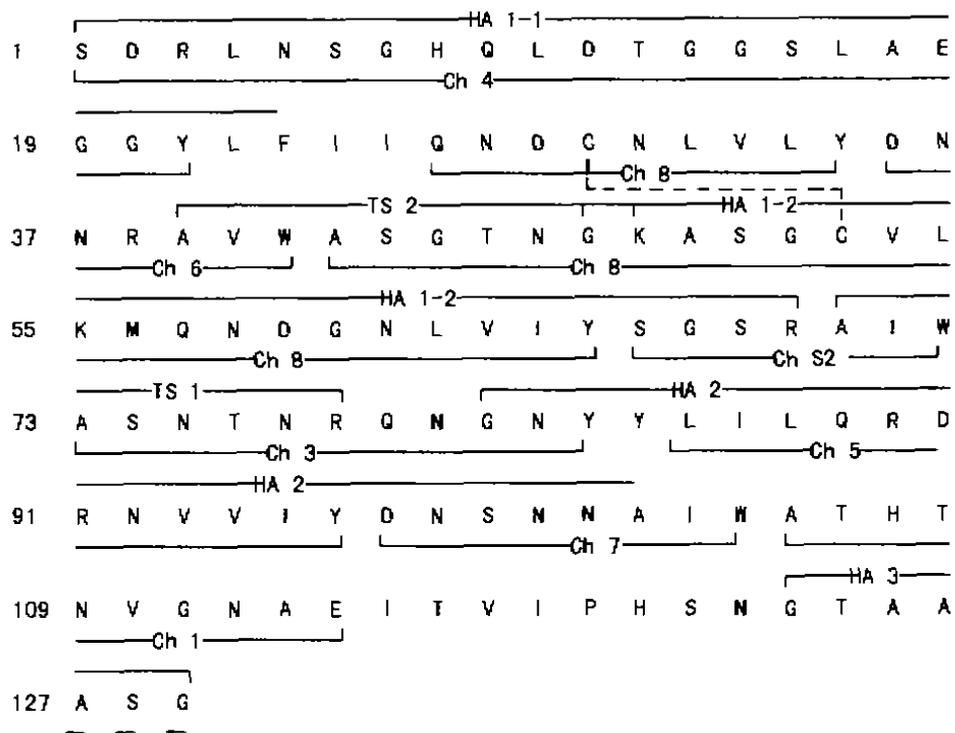


图4 GAFF-I 的一级结构。一对双硫键位于 29 位和 52 位氨基酸之间。HA、Ch 和 T 分别表示从羟胺裂解、凝乳蛋白酶和胰蛋白酶酶解产物纯化的肽段。肽段的编号见图 6 和 7。实线表示由氨基酸序列仪测出的或由氨基酸组成分析证实的氨基酸序列。箭头示羧肽酶 A 测出的 C-末端氨基酸。

Fig. 4 The primary structure of GAFF-I. A disulfide is located between the residues 29th and 52th. HA, Ch and T donate peptides derived from hydroxylamine cleavage, α -chymotrypsin and trypsin digested GAFF-I respectively. Their chain numbers correspond to those in Fig6 and Fig7. Solid line indicate the amino acid sequence obtained from automatic sequencing or verified by the amino acid composition analysis. The arrows indicate the sequence determined with carboxypeptidase A.

2.3 GAFF-I 的一级结构

由 GAFF-I 的 cDNA 核苷酸序列推导出的氨基酸全序列见图 3。以该序列为导向进行 GAFF-I 肽段的分离、纯化和测序, 建立 GAFF-I 的氨基酸全序列和双硫键定位 (图 4)。

由 cDNA 导出的氨基酸序列预期 GAFF-I 含有 3 个 Asn-Gly 肽键 (46-47, 81-82 和 122-123)。羟胺是专一裂解 Asn-Gly 的有效试剂。GAFF-I 的羟胺裂解产物 SDS-PAGE 分离到 3 条带, 分子量各为 14、10 和 5kD。14kD 带是未裂解的 GAFF-I。10 和 5kD 带编号为 HA1 和 HA2。测序结果 (图 5) 表明, HA1 包含 HA1-1 和 HA1-2 两条肽链, 由一对双硫键连接, 因此每一个 Edman 降解都得到两个 PTH-aa, 各解出 24 个氨基酸序列 (图 4), 与图 3 推导出的序列的第 1 和第 18 位为 R 和 Q 不一致。HA2 解出 22 个氨基酸序列也与预期一致 (图 3、4)。HA3 是羟胺裂解的另一小肽, 它包含了 C-末端。

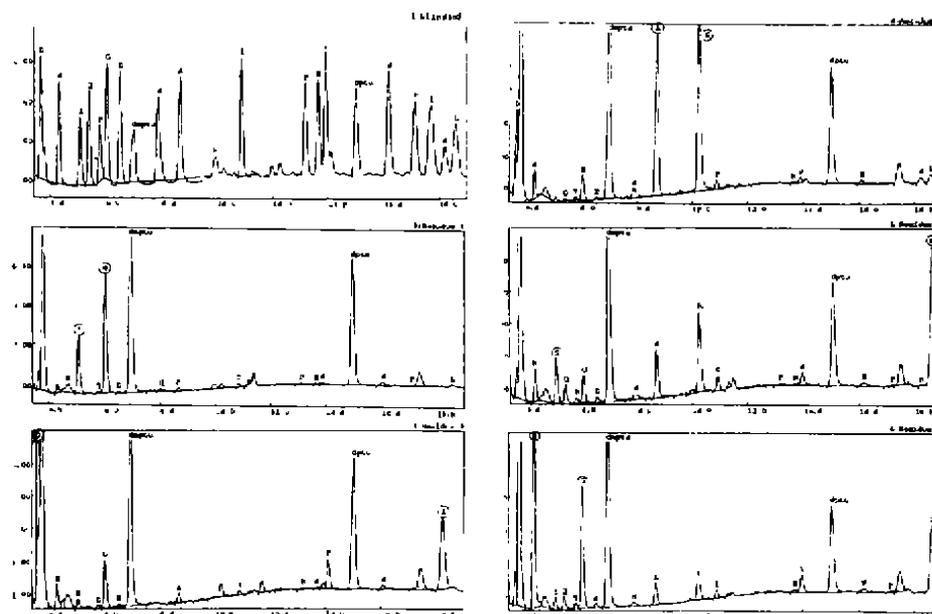


图5 用自动氨基酸序列仪测定肽 HAI 前 5 个残基 (循环 2-6) 产生的 PTH-氨基酸图。每个循环都有 2 个相同量的 PTH 氨基酸, 这证实 HAI 是由 HAI-1 和 HAI-2 二个肽组成, 这 2 个肽的前 5 个氨基酸序列各为 SDRLN- 和 GKASG-。

Fig. 5 PTH-aa released from peptide HAI in first 5 residues of automatic Edman degradations (cycle 2-6). In each cycle two PTH-aa of equal mol. appear that verifies that HAI consists of peptide HAI-1 of SDRLN- and HAI-2 of GKASG-.

图 6 是 α -糜蛋白酶酶解 GAFF-I 的产物通过 RP-HPLC 纯化的图谱。根据肽段 Ch1、Ch3、Ch4、Ch5、Ch6、Ch7 的氨基酸组成分析结果, 确定它们在全序列中的位置 (图 4), 完全符合图 3 推导出的氨基酸序列。肽 Ch8 由一对双硫键连接的两条肽链组成, 由序列测定定位双硫键在 29 和 52 位氨基酸之间 (图 4)。

图 7 是用阳离子交换高效液相色谱纯化 α -糜蛋白酶和胰蛋白酶酶解 GAFF-I 产物的图谱, 得到 3 个含色氨酸的碱性肽段 ChS2、TS2 和 TS3, 测序结果 (图 4) 表明它们的氨基酸序列与预期结果一致。

结果表明用 Edman 降解和氨基酸组成分析测定的 GAFF-I 的氨基酸序列与由 cDNA 核苷酸序列推导出的氨基酸序列 98.4% 是一致的。GAFF-I 是 129 个氨基酸组成的多肽链, 富含天冬酰胺 (19) 和甘氨酸 (14), 内含一对双硫键, 计算分子量为 13958 Da。

2.4 蛋白质氨基酸序列相似性比较

通过检索蛋白质数据库得知, GAFF-I 的氨基酸序列与雪花莲 (*Galanthus nivalis*) 凝集素 LECNA2 (Van Damme *et al.* 1991) 的氨基酸序列有很高的相似性。图 8 将两个蛋白质的氨基酸全序列由 N-末端对齐比较, 可见凝集素的 105 个氨基酸中有 65% 与 GAFF-I 序列相同或匹配, 而且一对双硫键均定位于 29 位和 52 位氨基酸之间。

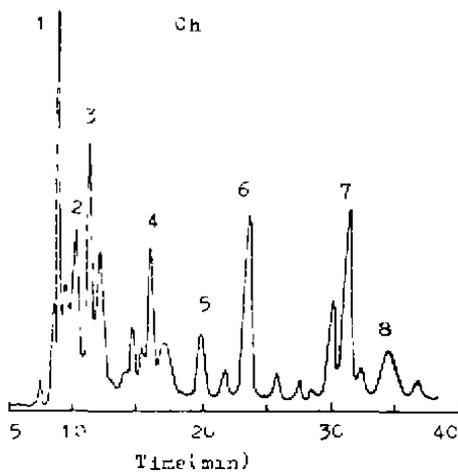


图6 GAFF-I 的凝乳蛋白酶酶解产物中肽的 RP-HPLC 分离谱。洗脱液为 20-30% 乙腈的 0.05% TFA 溶液。检测波长 220 nm。

Fig.6 RP-HPLC separation of peptides of digested GAFF-I by chymotrypsin, monitored at 220nm, eluted with 20~30% acetonitrile of 0.05% TFA.

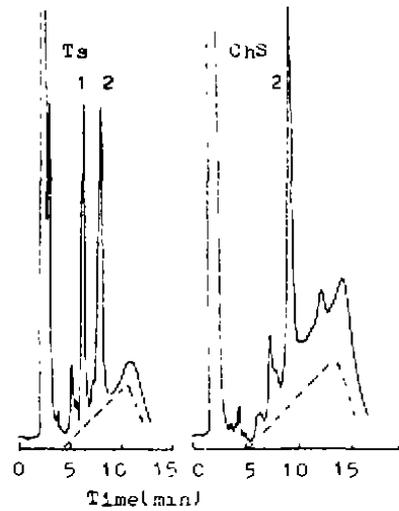


图7 GAFF-I 的胰蛋白酶 (TS) 和凝乳蛋白酶 (ChS) 酶解产物中肽的阳离子交换 HPLC 分离谱。洗脱液为 pH6.2 的 0.05~0.2 mol/L 乙酸铵溶液。

Fig.7 Cation exchange HPLC separation of peptides of digested GAFF-I by trypsin (TS) and chymotrypsin (ChS), eluted with 0.05~0.2 mol/L NH₄Ac at pH6.2.

	1	10	20	30	35
GAFF-I	S D R L N S G H Q L D T G G S L A E G G Y L F I I Q N D C N L V L Y D				
		L S G L T G L G + + F I + Q D C N L V L Y D			
LECGNA2	Q N I L Y S G E T L S T G E F L N Y G S F V F I M Q E D C N L V L Y D				
GAFF-I	N N R A V W A S G T N G K A S G C V L K M Q N D G N L V I Y S G S - R				
	+ + + + W A + T G + C L M Q D G N L V + Y S +				
LECGNA2	V D K P I W A T N T G G L S R S C F L S M Q T D G N L V V Y N P S N K				
GAFF-I	A I W A S N T N R Q N G N Y Y L I L Q R D R N V V I Y D N S N N A I W				
	I W A S N T Q N G N Y I L Q + D R N V V I Y A				
LECGNA2	P I W A S N T G G Q N G N Y V C I L Q K D R N V V I Y G T E R W A T G				
GAFF-I	A T H T N V G N A E I T V I P H S N G T A A A S G	129			
LECGNA2	- 105				

图8 GAFF-I 和雪花莲凝集素 LECGNA 2 的氨基酸全序列之间相似性比较。中间行标出相同和相匹配 (+) 的氨基酸。

Fig.8 Comparison of the complete amino acid sequence between GAFF-I and snowdrop lectin LECGNA 2 (Van Damme *et al.*, 1991). Homologous and match (+) amino acids are indicated in middle line.

3 讨论

3.1 利用自动 Edman 降解测定肽链的氨基酸序列再将已知序列的肽链叠合拼接是目前测

定蛋白质全序列的直接方法。分离和纯化由酶解或化学裂解一个未知序列蛋白质产生的肽段既费时费钱且有丢失肽段的危险。DNA 的 PCR 扩增、克隆和测序技术的迅速发展简化了蛋白质测序工作。本实验证明 GAFF-I 由 cDNA 的核苷酸序列推导出的氨基酸序列与直接测出的氨基酸序列 98.4% 是一致的。看来, 解一个大多肽链的氨基酸全序列, 如下路径快捷得多。首先用直接方法测出 N 端和 C 端部分氨基酸序列, 据以合成引物, 通过 RT-PCR 技术从总 RNA 制备编码该多肽链的 cDNA, 从 cDNA 的核苷酸序列导出多肽链的氨基酸全序列, 在此引导下通过直接法测氨基酸序列予以验证。目前蛋白质 C-末端酶解测序法不足以确认借以合成一个寡核苷酸引物所须的 5 个以上氨基酸序列, 因此尚须应用 3'-RACE 技术确定编码 cDNA 序列, 解出蛋白质 C-端肽的序列。

3.2 不同于目前文献报告的多种抗真菌活性多肽, 如 Thionin 类、植物 Defenin 等 (Brockaert et al. 1997), GAFF-I 只对腐生性真菌有很强的抑制作用。GAFF-I 的一级结构与雪花莲凝集素高度相似, 后者是一种甘露糖专一的凝集素。这暗示 GAFF-I 抗菌活性的专一性可能与其对腐生性真菌表面某种糖配基的专一结合有关。

致谢 美国夏威夷大学辛世文教授、杨文静博士和云南省农业科学院鄢波博士帮助进行 cDNA 克隆和测序。

参 考 文 献

- 胡 忠, 杨增明, 王 钧, 1988. 天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性. *云南植物研究*, **10**: 421-426
- 胡 忠, 黄清藻, 1994. 天麻中抗真菌蛋白质的诱导和积累. *云南植物研究*, **16**: 169-177
- 徐秀璋, 1988. 蛋白质序列分析技术. 北京: 科学出版社
- Bornstein P, Balian G, 1977. Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. *Methods in Enzymol.*, **67**: 132-144
- Brockaert W F, Cammue P A, De Bolle N F C et al, 1997. Antimicrobe peptides from plants. *Critical Rev Plant Sci.*, **16**: 197-323
- Jones J D G, Duinsmir P, Bedbrock J, 1985. High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.*, **4**: 2411-2418
- Van Damme J M, Kaku H, Perini F et al, 1991. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin. *Eur J Biochem.*, **202**: 23-30