

中国明对虾溶菌酶基因克隆、重组表达与性质分析

卜兴江^{1,2}, 杜欣军¹, 周文杰³, 赵小凡¹, 王金星¹

1 山东大学生命科学院, 济南 250100

2 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000

3 衡水学院生命科学系, 衡水 053000

摘要: 溶菌酶是机体先天免疫系统中一个重要的效应分子, 参与机体多种免疫反应, 在溶菌过程中形成一个水解体系, 破坏和消除侵入体内的病原, 从而实现机体的免疫防御。从中国明对虾中克隆得到了溶菌酶基因(称为 FcLyz 基因), 该基因全长 709 bp, 其完整的阅读框为 477 bp, 编码 158 个氨基酸, 前 18 个氨基酸(-1~18)为信号肽, 成熟肽由 140 个氨基酸组成(1~140aa), 其分子量为 16.2 kD。经 SMART 分析, 该基因具有 1 个溶菌酶 1(LYZ1)结构域(19~130aa)。半定量 RT-PCR 分析结果表明溶菌酶虽在多种组织中有较低水平的组成性表达, 但在细菌诱导的血细胞、心脏、肝胰腺和鳃等多种组织中表达上调。将中国明对虾溶菌酶基因的成熟肽亚克隆进原核表达载体 pET-30a (+)中, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 再进行诱导表达和亲和纯化, 得到了纯化的重组溶菌酶, 并进行了抑菌活性检测。结果表明, 重组对虾溶菌酶对革兰氏阳性菌的抑菌能力较强, 最小抑菌浓度达到 3.43 $\mu\text{mol/L}$, 但对革兰氏阴性菌抑制作用较小。上述结果表明, 该溶菌酶作为一种重要的免疫效应分子, 参与了对虾的免疫防御反应。

关键词: 中国明对虾, 溶菌酶, 先天免疫, 重组表达

Molecular Cloning, Recombinant Expression and Characterization of Lysozyme from Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

Xingjiang Bu², Xinjun Du¹, Wenjie Zhou³, Xiaofan Zhao¹, and Jinxing Wang¹

1 School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China

2 School of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

3 Department of Life Sciences, Hengshui College, Hengshui 053000, China

Abstract: Lysozyme hydrolyses bacterial cell walls and acts as a nonspecific innate immunity molecule against the invasion of bacterial pathogens. We cloned the cDNA of lysozyme from *Fenneropenaeus chinensis* and named Fc-lysozyme (FcLyz in short). The full length of the gene was of 709 bp, and the open reading frame (477 bp) encoded 158 amino acids. The predicted protein had a signal peptide (-1~ -18 residue) and molecular weight of the mature protein (residue 1~140) was of 16.2 kD. A Lyz 1 domain (residue 1~130) in the lysozyme was found by SMART analysis. The results of semiquantitative RT-PCR showed that FcLyz was constitutively expressed in tested tissues in a low level in normal shrimp, and up-regulated in hemocytes, heart, hepatopancreas and gill of bacterial challenged shrimp. The DNA fragment of mature Fc-Lys was subcloned to pET-30a (+) expression vector, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and then induced by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). The antibacterial activity of the purified recombinant FcLys was analyzed and minimal inhibitory concentration (MIC) was assayed. The

Received: September 12, 2007; **Accepted:** October 25, 2007

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2007AA09Z425, 2006AA100311), and the National Natural Science Foundation of China (No. 30770282).

Corresponding author: Jinxing Wang. Tel: +86-531-88364620; E-mail: jxwang@sdu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30770282)和 863 计划(No. 2007AA09Z425, 2006AA100311)资助。

recombinant protein showed high antibacterial activity against some Gram-positive bacteria, and MIC reached 3.43 $\mu\text{mol/L}$, and relatively low activity against Gram-negative bacteria. All together, the Fc-Lys was regulated by pathogen infection and had antibacterial activity. This suggested that the FcLyz may be one of the important molecules against pathogens in innate immunity of the shrimp.

Keywords: Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), lysozyme, innate immunity, recombinant expression

溶菌酶[Lysozyme (EC3.2.1.17)]是一种能水解粘多糖的碱性酶, 它能催化细菌细胞壁中粘多糖 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1, 4 糖苷键的水解, 导致细菌细胞壁破裂、内容物逸出而使细菌死亡。目前, 一般将溶菌酶分为六类: (1)鸡型溶菌酶, 又称 c 型溶菌酶(c-type), 包括来自于胃的溶菌酶和结合钙离子的溶菌酶; (2)鹅型溶菌酶, 又称 g 型溶菌酶(g-type); (3)植物溶菌酶; (4)细菌溶菌酶; (5)T4 噬菌体溶菌酶; (6)无脊椎动物溶菌酶, 又称 i 型溶菌酶(i-type)^[1-6]。其中 i 型(i-type)溶菌酶是溶菌酶家族的一个新成员, i 型溶菌酶最初是在海星(*Asterias rubens*)中发现的^[7], 近年来已经被广泛研究^[8-10]。在 GenBank 数据库中有许多甲壳类十足动物的溶菌酶核苷酸序列, 在对虾中已经发现的溶菌酶大多数属于 c 型溶菌酶, 如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (AF425673), 日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*) (BAC57467), 斑节对虾(*Penaeus monodon*) (B1784440)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (AAV83994)。i 型(i-type)溶菌酶在对虾中也有发现, 如凡纳对虾(*L. vannamei*) (BF023863, BF024192)和白滨对虾(*L. setiferus*) (BF024309)^[11]。近来, 已有人对日本对虾、凡纳对虾和斑节对虾溶菌酶重组蛋白的溶菌活性进行了研究^[11-13], 有关中国明对虾溶菌酶基因工程的研究还未见报道。我们从中国明对虾(*F. chinensis*)中克隆得到了溶菌酶基因, 研究了其在细菌刺激后的对虾中的表达模式。构建的了表达载体 FcLyz-pET-30a(+), 在大肠杆菌中诱导表达, 并对表达产物的抗菌活性进行了检测。为溶菌酶的进一步开发应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PCR 试剂、TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶等为 TaKaRa Biotechnology 公司(大连)的产品, DNA 胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒购于 Sangon(上海)。T₄DNA 连接酶为 Fermentas 公司的产品。琼脂糖电泳试剂、质粒提取试剂、细菌培养试剂以及 SDS-PAGE 电泳试剂等为分析纯试剂。酶标仪 ELX800 为 Bio-Tek 公司产品。大肠杆菌感受态菌株

DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 对虾溶菌酶基因(FcLyz)的克隆

首先根据基因库中日本对虾、凡纳滨对虾和斑节对虾等溶菌酶的序列, 设计简并引物: FcLys F1 5'-CGA GTC GTC CTT CAA CAC GG-3'和 Lys R 5'-CAC TTG (C/T)TG TTG TAA GCC ACC-3', 利用这 2 对引物从对虾中血细胞中得到溶菌酶的 225 bp 的中间片段, 经 BLASTtx 比对, 与斑节对虾的相似性达到 93%。然后再利用 FcLyz F1 与 3' anchor R (5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C-3')进行溶菌酶 3'端克隆, 利用 特异性引物 FcLyz R2(5'-CAC TTG CTG TTG TAA GCC ACC-3')和 5'-primer (5'-TAC GGC TGC GAG AAG ACG ACA GAA-3')扩增溶菌酶的 5'端。

1.2.2 对虾溶菌酶表达模式分析

利用细菌和生理盐水刺激诱导中国明对虾的方法见参考文献[14]。用等量混合的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的活菌混合液为免疫刺激物, 按每尾虾 3×10^7 个细菌从对虾尾节处注入活菌混合液, 同时向另外一批对虾中注射与菌液相同体积的生理盐水作为假刺激, 充气饲养 24 h。正常对虾作为对照。在刺激后 24 h 分别解剖获取对虾的不同组织, 包括: 血细胞、血淋巴、心脏、肝胰腺、胃、鳃、肠、卵巢、精巢。取出的组织立即提取总 RNA。

根据 FcLyz 的序列, 设计 1 对引物: FcLyz F3 5'-AAG GTC TTC GGG AAG TGC GAA-3'和 R3 5'-CTA GAA TGG GAA TAT AGA GTT GGA-3'。分别利用正常对虾、假刺激(生理盐水刺激)和细菌(大肠杆菌和鳃弧菌)刺激对虾的血细胞、心脏、肝胰腺、胃、肠和鳃等组织的 RNA 进行 RT-PCR 分析, 以 β -actin 为内参(引物为 actin F 5'-AGT AGC CGC CCT GGT TGT AGA C-3'和 Actin R 5'-TTC TCC ATG TCG TCC CAG T-3')。PCR 反应进行 3 次。以 FcLyz 扩增带和 β -actin 扩增带的比值进行统计分析。

1.2.3 重组表达引物设计与溶菌酶(FcLyz)成熟肽基因的扩增

根据克隆得到的中国明对虾溶菌酶的 cDNA 序

列和表达载体 pET-30a(+)克隆位点两端的酶切识别序列, 设计一对用于原核表达的特异引物 LYZexF 和 LYZexR, 引物两端分别加入 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点(粗体表示): LYZex F: 5'TAC TCA **GAGCTC** AAG GTC TTC GGG AAG TGC GAA 3', LYZex R: 5' TAC TCA **CTCGAG** CTA GAA TGG GAA TAT AGA GTT GGA 3'。以中国明对虾血细胞 cDNA 为模板, 以 LYZexF 和 LYZexR 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 50 μ L, 扩增条件: 94°C 3 min; 94°C 30 s、55°C 45 s、72°C 45 s 共 33 循环; 72°C 10 min。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测得到大约 430 bp 左右的扩增产物, 并将该条带在紫外线下切下, 胶纯化回收 DNA 备用。

1.2.4 *FcLyz*-pET-30a(+)重组质粒的构建

分别用 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切 PCR 扩增的 *FcLyz* 基因和 pET-30a(+)载体。酶切后 *FcLyz* 基因用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收, pET-30a(+)载体进行制备电泳, 用胶纯化试剂盒回收酶切产物。将纯化后的两者用 T₄DNA 连接酶连接 16°C 过夜。

1.2.5 *FcLyz*-pET-30a (+)重组质粒转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)

将 *FcLyz*-pET-30a(+)重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 以 LYZexF 和 LYZexR 为引物 PCR 筛选阳性菌株, 挑取 PCR 筛选到的阳性菌落, 37°C 振荡培养并提取质粒, 经过 PCR 验证和测序验证确认基因已插入。用验证正确的重组质粒 2 μ L 直接转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于 LB+Kan(卡那霉素)平板, 37°C 倒置过夜培养。

1.2.6 试表达阳性菌株及诱导不同时间的表达

从上述平板上挑取 2 个单菌落, 分别放入盛有 5 mL LB+Kan 液体培养基的试管中, 37°C 振荡培养过夜, 次日取 50 μ L 过夜培养液加入到 5 mL LB+Kan 液体培养基中培养, 37°C 振荡培养 3 h 至 OD_{600} 值在 0.8~1.0 之间, 然后加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续 37°C 振荡培养诱导 3 h。诱导前, 随机从一个样品中取出 0.5 mL 菌液, 作为电泳检测时的对照。

表达结束后, 各取出 0.5 mL 菌液, 5000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 包括未诱导的样品, 重悬于 100 μ L 去离子水中, 以此为电泳样品进行 12.5%的 SDS-PAGE。根据电泳结果鉴定表达菌株。同时选取诱导表达为阳性的菌株进行不同诱导时间的表达

实验, 步骤如上, 只是在加入 IPTG 诱导后, 每隔 1 h 取 0.5 mL 菌液留样, 直至诱导 6 h, 进行 12.5% SDS-PAGE 检测。

1.2.7 重组蛋白 *FcLyz* 大规模诱导表达

挑取表达菌株阳性单克隆在 LB+Kan 液体培养基中 37°C 过夜振荡培养, 次日, 按照体积比 1:100 加入到 200 mL LB+Kan 液体培养基中培养, 37°C 振荡培养 3 h 后, OD_{600} 值达到 0.8~1.0, 再加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 37°C 振荡培养 3 h, 诱导前取出 0.5 mL 菌液作为诱导前对照样品。

诱导培养结束后, 取出 0.5 mL 菌液作为对照, 剩下的菌液在合适的离心管中 7000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 细胞重悬于 20 mL 预冷的 1 \times PBS, 并加入 Triton X-100 至终浓度为 1%, 超声波破碎细胞, 将破碎后的菌液 10 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液和沉淀, 进行 12.5%SDS-PAGE 检测。

1.2.8 从包涵体中纯化目的蛋白

参照 Kuhelj 等^[15]方法进行, 主要步骤为, 将收集的沉淀用 Buffer A(50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.1% Triton X-100, pH 8.0)洗涤 3 次, 再用 Buffer B(50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, 2 mol/L urea, pH 8.0)洗涤 3 次, 将洗涤后的沉淀溶于 20 mL Buffer C(0.1 mol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 8 mol/L urea, pH 8.0)中, 37°C 快摇 1 h 后, 4°C 下 10 000 r/min 离心 10 min, 保留上清, 用 Ni²⁺-NTA 柱亲和层析, 所得变性的纯化重组蛋白进行梯度透析(第一次透析 0.1 mol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Cysteine, 4 mol/L urea, pH 8.0, 第二次和第三次透析的脲浓度变为 2 mol/L 和 0 mol/L), 复性后样品经过离心, 获得重组目的蛋白。

1.2.9 重组 *FcLyz* 活性检测

首先采用管碟法检测 *FcLyz* 抗菌活性: 5 mL LB 液体培养基 37°C 200 r/min 过夜培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 取 3~5 μ L 菌加至 8 mL 50°C 的液态 PB 固体培养基中, 混匀, 作为上层胶铺平板, 1.5% 琼脂作为下层胶管碟法测定 *FcLyz* 抗菌活性, 加入 100 μ L 纯化的重组蛋白 *FcLyz*, 1 μ L Amp(25 mg/mL)作为对照, 37°C 过夜培养, 观察抑菌圈大小。然后测定了重组对虾溶菌酶的最小抑菌浓度(MIC): 取革兰氏阳性菌: 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*), 蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*), 巨大芽胞杆菌(*Bacillus*

megaterium), 苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*), 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和革兰氏阴性菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)。并将这些细菌在 5 mL LB 液体培养基中 37°C, 200 r/min 过夜培养, 用 PB 液体培养基稀释至 OD_{600} 为 0.001 左右。将纯化的 FcLyz 重组蛋白用缓冲液(0.01%乙酸, 0.2%BSA)稀释至浓度为 160 $\mu\text{g/mL}$, 将 100 μL FcLyz 重组蛋白(160 $\mu\text{g/mL}$)加入 96 孔培养板中, 并用缓冲液(0.01%乙酸, 0.2%BSA)作梯度稀释为 80 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$... 0.625 $\mu\text{g/mL}$, 用 100 μL PB 液体培养基和 PBS 透析液为对照, 并用氨苄青霉素设置阳性对照。每孔中加入稀释后的测试菌 100 μL , 37°C 静置培养 18~48 h, 酶标仪测定 630 nm 波长下吸光度, 与阳性对照比较, 以细菌生长被完全抑制的最小浓

度为 MIC。

1.2.10 SDS-PAGE 分析

采用 Laemmli 等^[16]的方法进行。

1.2.11 蛋白质含量测定

参照 Bradford 方法(又称考马斯亮蓝染色法)^[17]。

2 结果

2.1 FcLyz 基因扩增

我们从中国明对虾血细胞中克隆得到了溶菌酶(FcLyz)基因(图 1)。该基因全长 709 bp, 其完整的阅读框为 4773 bp, 编码 158 个氨基酸, 前 18 个氨基酸为信号肽, 成熟肽由 140 个氨基酸组成(1-140aa), 其分子量为 16.1 kD, 理论等电点为 8.81。经 SMART 分析, 该基因具有 1 个溶菌酶 1(LYZ1)结构域(1-130aa)。

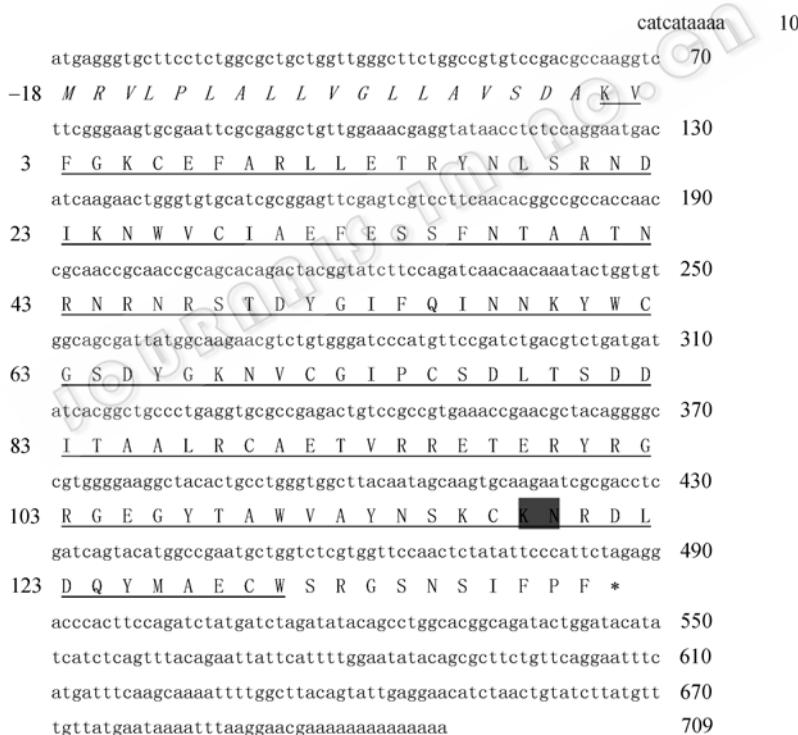


图 1 中国明对虾溶菌酶的基因序列及其演绎的氨基酸序列

Fig. 1 Complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of lysozyme from Chinese shrimp (*F. chinensis*)

The italic sequence is the signal peptide, and the sequence underlined is the LYZ 1 domain. Poly A signal is double underlined. The different residues (2 amino acids) with Yao's sequence (AAV83994) was shown in gray background

通过与 GenBank 中的同源序列比较, 与 Yao 等(中国科学院海洋研究所)在基因库登录(登录号: AAV83994)的中国明对虾的溶菌酶的一致性为 98%, 只存在 2 个氨基酸的差异。与斑节对虾(*P. monodon*)

溶菌酶一致达到 93%, 与罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)的一致性为 92%, 与短沟对虾(*P. semisulcatus*)的一致性为 88%, 凡纳滨对虾(*L. vannamei*)为 87%, 日本对虾(*Marsupenaeus*

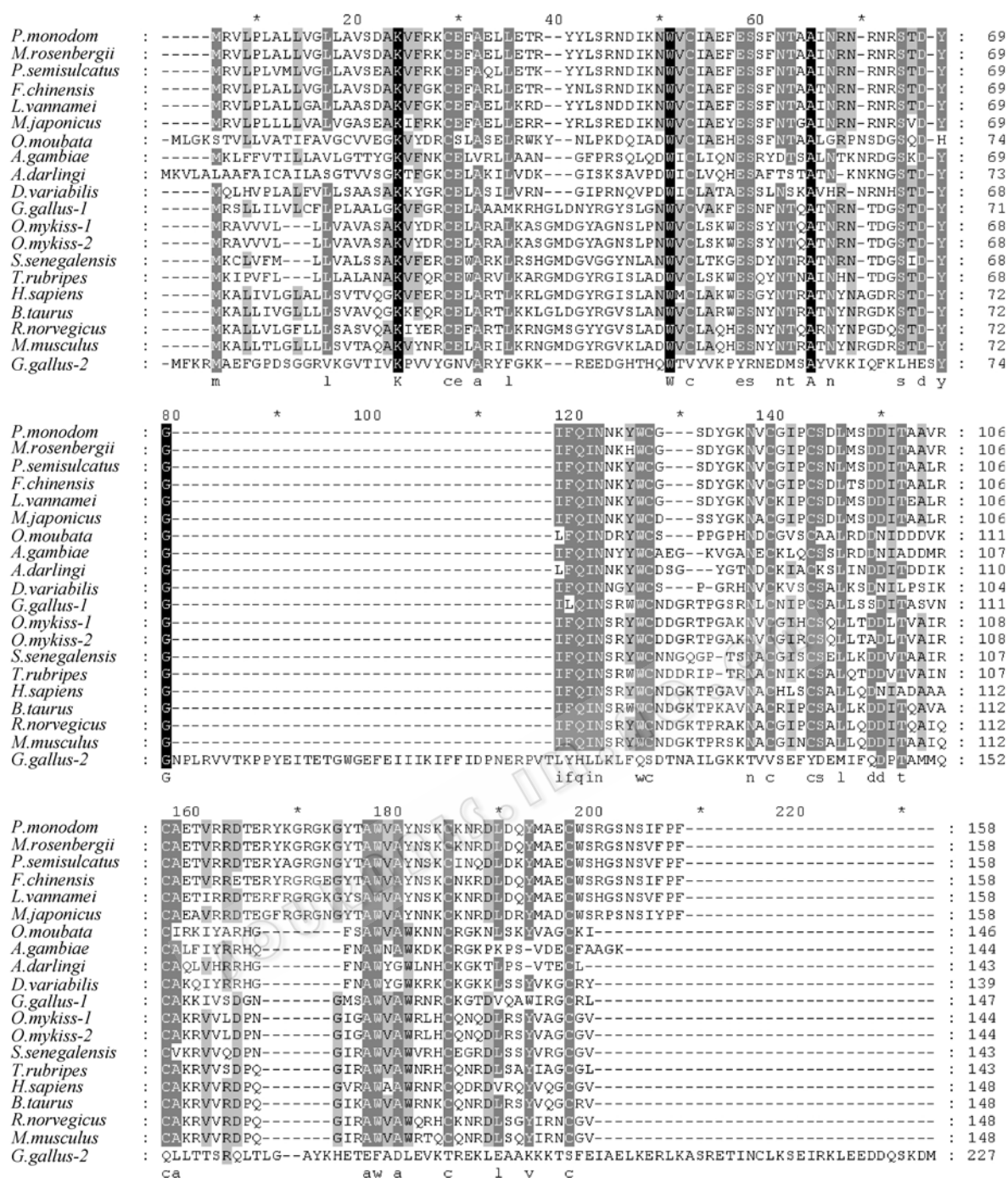


图2 中国对虾溶菌酶氨基酸序列与其它动物(包括对虾)和人类的溶菌酶序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of FcLyz amino acid sequence with that of other animals (including shrimp) and human

The sequence accession number in GenBank was given in Fig. 3

japonicus)为 82%。与冈比亚按蚊的一致性为 43%，地中海鲷(*Solea senegalensis*) 的一致性为 45%，与小鼠(*Mus musculus*)的一致性为 48%。与其他生物溶菌酶的比对结果见图 2。

根据基因库中报道的对虾和其它生物的溶菌酶

序列, 利用 MEGA 软件(<http://www.megasoftware.net/>)构建溶菌酶的进化树。从系统进化树(图 3)可以看出, 不同动物中的溶菌酶可以分为 3 个大组, 第一组为对虾的溶菌酶, 在溶菌酶分类上属于 C-型溶菌酶; 第二组为昆虫和蜘蛛等节肢动物的溶菌酶,

第三组为脊椎动物的溶菌酶。只有鸡的一种溶菌酶比较特殊, 单列为一支。

2.2 *FcLyz* 基因的表达模式

半定量 RT-PCR 结果显示(图 4), *FcLyz* 基因的在正常对虾中不同组织中都有不同水平的组成性表达, 当用生理盐水进行假刺激后, 可以看出在所有分析的组织或细胞(血细胞、心脏、肝胰腺、胃、鳃和肠)中都有不同程度的上调表达, 与病原细菌刺激相比较, 假刺激在血细胞、心脏、肝胰腺和鳃中的上调幅度不如病原菌刺激的上调幅度大, 特别是在血细胞和肝胰腺组织中, 细菌刺激后溶菌酶的表达量增加明显。但在胃和肠组织中病原刺激不如假刺

激上调幅度大。

2.3 *FcLyz*-pET-30a(+)重组质粒的构建和筛选

用 *FcLyz* 基因的表达特异引物 LYZexF 和 LYZexR 进行 PCR 扩增, 得到了预期的 1 条 430 bp 左右的扩增产物(图 5)。将 *FcLyz* 的 PCR 扩增产物用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切, 连接到经过同样酶切的 pET-30a(+)质粒上, 转化 *E. coli* DH5 α , 用基因特异性引物进行 PCR, 筛选了 4 个单菌落, 结果 4 个菌落都呈现期望片段 430 bp 的 PCR 条带。说明这些菌株含有 *FcLyz*-pET-30a(+)重组表达质粒。然后将 PCR 筛选到的阳性菌株扩增培养, 提取质粒进行测序验证; 结果表明 *FcLyz*-pET-30a(+)重组质粒构建正确。

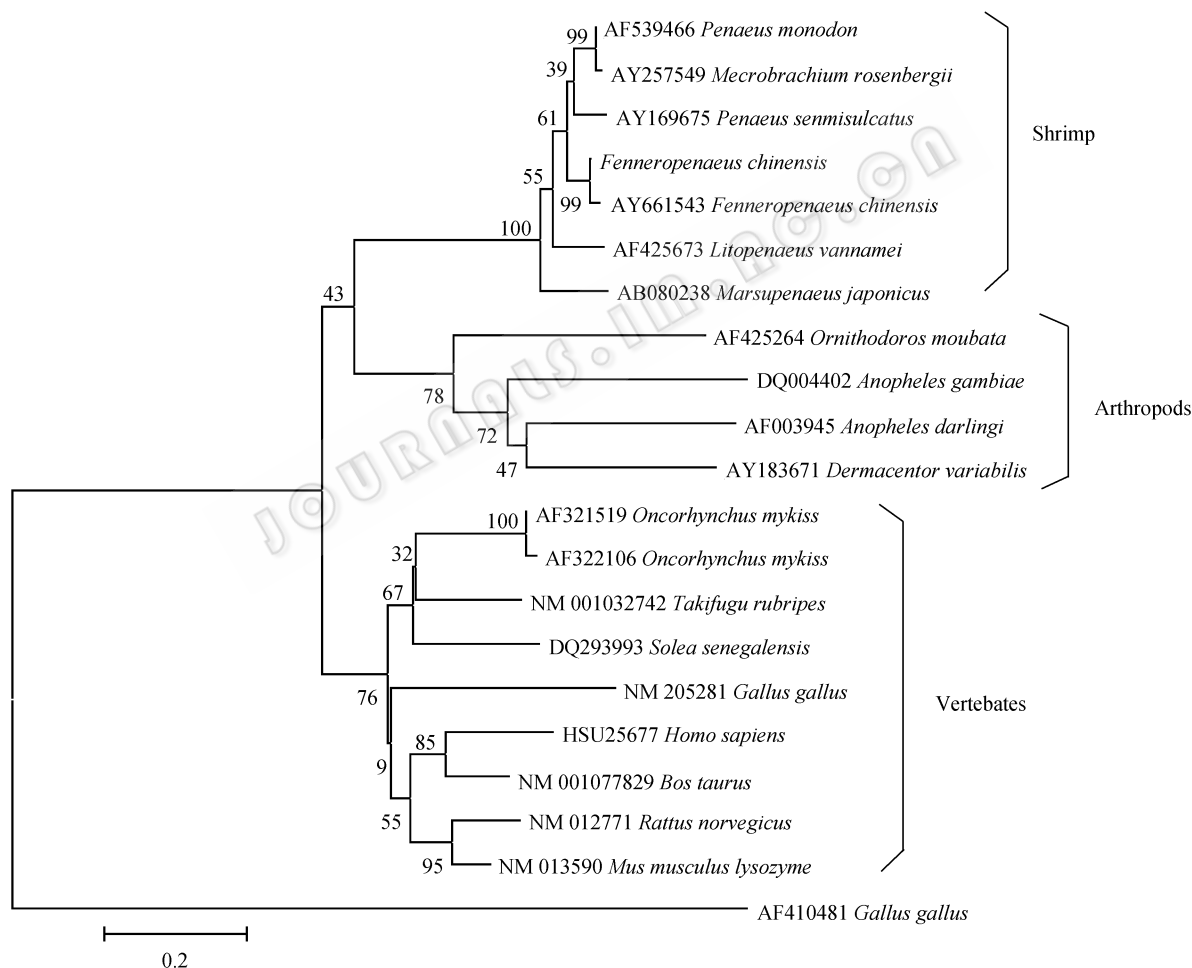


图 3 不同生物溶菌酶的系统进化树(所用序列见图 2)

Fig. 3 Phylogenetic tree of lysozymes from different organisms
(the sequences used for the analysis were listed in Fig. 2)

The NJ tree was obtained using MEGA (3.1). Bootstraps (1000) were performed for the NJ trees to verify repeatability of results

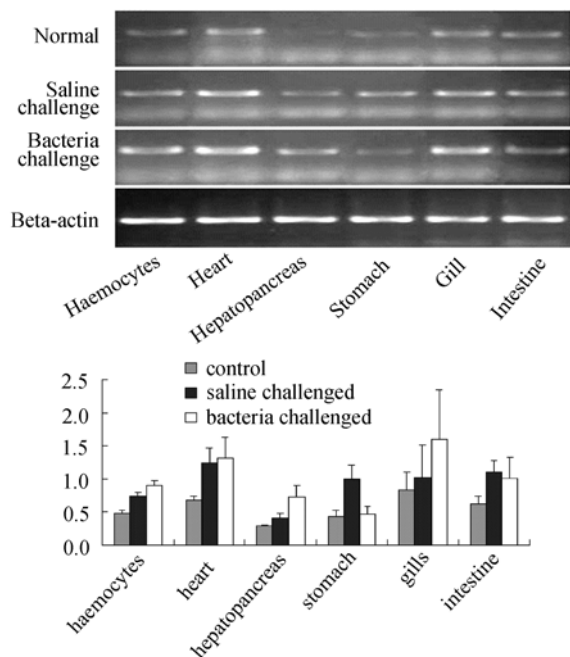


图4 半定量 RT-PCR 分析中国明对虾溶菌酶的表达模式

Fig. 4 *FcLyz* expression profiles in different tissues of normal, fake challenged and bacteria challenged shrimp

(Upper panel): Expression profile of *FcLyz* in different tissues. (Bottom panel): Statistical analysis of the semi-quantitative RT-PCR. Data was expressed in the ratio of *FcLyz* to β -actin

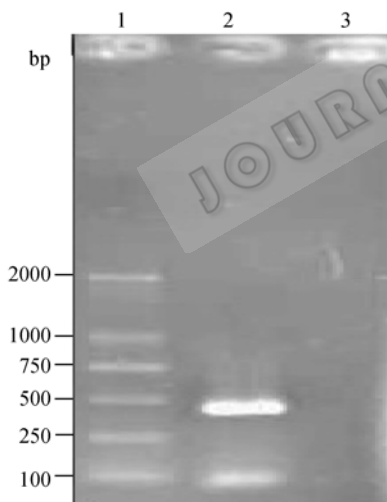


图5 PCR 扩增 *FcLyz* 成熟肽序列

Fig. 5 Amplification of *FLYZ* by PCR

1: DNA marker DL2000; 2: amplification of *FLYZ*; 3: negative control

2.4 重组溶菌酶(*FcLyz*)诱导表达

从上述阳性菌株中提取 *FcLyz*-pET-30a(+)重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 先进行小规模诱导表达, 经过 SDS-PAGE 检测显示, 诱导后的样品在

27 kD 左右处比诱导前对照明显多出 1 条带, 根据生物学软件计算, 去掉信号肽后的 *FCL* 基因编码 140 个氨基酸, 分子量为 16.214 kD, 此外, 载体上融合表达的 His-Tag 标签等序列的分子量 5.95 kD 左右; 因此, 重组蛋白的分子量应为 22.16 kD。但纯化蛋白电泳显示 27 kD 左右, 比预期的要大(见图 6), 这一点将在讨论部分说明。同时, 也能看出不同菌株的表达情况(图 6), 利用 Labworks 系统软件进行了相对含量分析, 表明不同表达菌株的目的蛋白表达量基本上没什么差别, 目的蛋白约占全菌总蛋白的 30%。此外, 不同诱导时间取样后经 12.5%SDS-PAGE 检测显示, 加入诱导物 IPTG 后 3~6 h 目的蛋白表达量较大, 为了使表达量达到最大并恒定, 选取诱导时间为 3 h(图 7)。接着进行大规模诱导表达, 并将表达后的菌液离心收集菌体。



图6 含有重组质粒的不同菌株的诱导表达

Fig. 6 Total proteins of the *FcLyz*-pET-30a(+) / BL21(DE3) induced by IPTG

1: non-induction control; 2, 3: total proteins of the *FcLyz*-pET-30a(+) / BL21(DE3) induced by IPTG

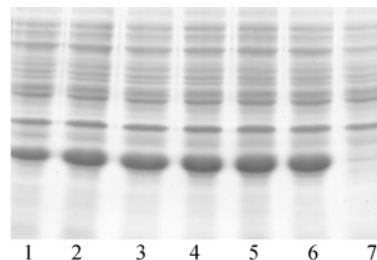


图7 含有重组质粒的同一菌株不同时间的诱导表达

Fig. 7 Total proteins of the *FcLyz*-pET-30a(+) / BL21(DE3) induced by IPTG for 1 to 6 hours

1~6: total proteins of the *FcLyz*-pET-30a(+) / BL21(DE3) induced by IPTG for 1 to 6 hours; 7: total proteins of the non-induced *FcLyz*-pET-30a(+) / BL21(DE3)

2.5 从包涵体中纯化重组蛋白

经过 12.5% SDS-PAGE 对大肠杆菌表达的上清液和沉淀进行分析, 上清液中未检测到目的蛋白, 发现目的蛋白存在于沉淀中, 说明目的蛋白的表达形成了包涵体, 成为不溶性沉淀。经过方法中描述的包涵体变性、纯化和复性处理后, 得到了可溶的重组蛋白 rFcLyz(图 8)。

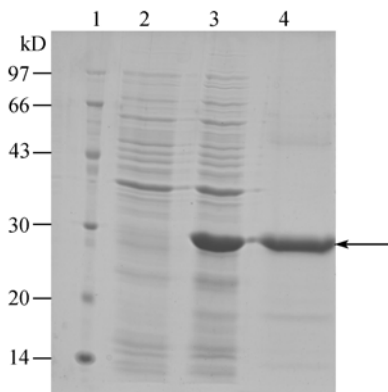


图 8 重组表达 FcLyz 的表达与纯化的 SDS-PAGE 检测
Fig. 8 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of rFcLyz from FcLyz-pET-30a(+)/E. coli BL21(DE3)

1: standard protein; 2: the non-induced strain; 3: same strain induced by IPTG; 4: purified rFcLyz by His bind resin chromatography. Arrow indicates target protein

用 1 升 LB 液体培养基中转培养含有重组质粒 FLYZ-pET30a(+) 的表达菌株 BL21(DE3), 并诱导表达, 收集菌体, 经过超声破碎(测蛋白含量), 对包涵体变性和复性处理后(测蛋白含量), 并用 Ni^{2+} -NTA 柱进行亲和层析纯化 FcLyz(测蛋白含量), 根据所测得的蛋白含量, 计算纯化 rFcLyz 得率如下表(表 1)。

表 1 FcLyz 纯化得率表(1000 mL)
Table 1 Purification of the FcLyz(1000 mL)

Steps	Total protein/ mg	Yield/%
Bacterial lysate	450	100
Supernate of renaturation	125	28
Purified rFcLyz	67	15

由表 1 以看出, 随着对包涵体的处理和亲和层析纯化的进行, 杂蛋白逐步丢失, 1000 mL 培养液收集的菌体, 经破碎、纯化最后得到目的蛋白为 67 mg, 目的蛋白的实际得率为 15%。

2.6 重组 FcLyz 蛋白的抗菌活性

管碟法测定纯化透析后 FcLyz 的抗菌活性, 加入 100 μL 纯化的 FcLyz(0.2 mg/mL 或 0.4 mg/mL), 100 μL 1×PBS 透析液作阴性对照, 1 μL Amp

(25 mg/mL)作为阳性对照。将平板置于 37°C 培养过夜, 观察抑菌圈大小。发现对金黄色葡萄球菌有抑菌活性, 而对大肠杆菌没有抑菌活性, 作为对照的透析液也没有抑菌活性(图 9)。

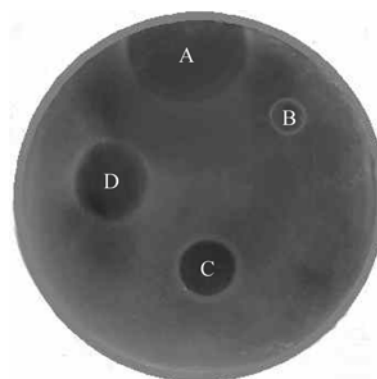


图 9 管碟法检测 FcLyz 重组蛋白对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 9 Inhibitory activity of recombinant FcLyz protein toward to *Staphylococcus aureus*

A: ampicillin(25 mg/mL); B: dialysis liquid (1×PBS, Control); C: purified rFcLyz (200 $\mu\text{g/mL}$); D: purified rFcLyz (400 $\mu\text{g/mL}$)

表 2 重组 FcLyz 的最小抑菌浓度

Table 2 The minimal inhibitory concentration (MIC) of rFcLYZ protein

Microorganism	MIC / ($\mu\text{mol/L}$)
Gram-positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.86
<i>Micrococcus luteus</i>	6.86
<i>Bacillus thuringiensis</i>	3.43
<i>Bacillus cereus</i>	3.43
<i>Bacillus subtilis</i>	3.43
<i>Bacillus megaterium</i>	3.43
Gram-negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	>10.29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.29

3 讨论

近年来, 对虾先天免疫研究取得的长足的进步。其免疫防御机制与昆虫有很大的相似性。综合起来, 天然免疫的生理反应可以分为三个步骤: 1) 感染的非己识别, 通过模式识别受体识别不同的病原相关的分子模式(PAMPs); 2) 调节途径激活的信息加工过程, 通过不同的信号转导途径引起相应的防御反应或效应分子基因的转录; 3) 免疫效应分子的表达或细胞免疫反应的激活, 最终清除病原或者

减缓病原物的反应。从对虾中发现了可能参与上述三个过程的多分子, 如可能参与先天免疫非己识别的模式识别受体, 包括革兰氏阴性菌结合蛋白^[14]、多种 C-型凝集素^[18-22]; 参与对虾免疫信号转导的分子, 包括 Toll 样受体^[23]及其配体; 多种参与清除病原的免疫效应分子, 如对虾素^[24, 25]甲壳肽^[26]、抗脂多糖因子^[27]和可能参与抗病毒防御的分子^[28]等。这些知识的积累将对对虾养殖中的疾病防治产生积极的影响。

溶菌酶是广泛存在于各种生物的一类抗菌分子。在多种对虾体内都有发现。我们所克隆得到的溶菌酶基因与 Yao 等(2005)在基因库登录的中国明对虾序列(No. AY661543)的氨基酸序列存在 2 个氨基酸的差异。可能是不同溶菌酶的 Isoforms。从 FcLyz 的表达模式可以看出细菌刺激可以上调该基因的表达。Burge 等^[29](2007)利用实时定量 PCR 和原位杂交方法研究了凡纳滨对虾在生理盐水和病原菌刺激后溶菌酶的表达模式和表达部位。溶菌酶主要是在血细胞或富含血细胞的组织里表达, 细菌或生理盐水刺激后, 前 4 小时溶菌酶表达水平下降, 之后表达水平逐渐恢复正常水平。本实验没有检测刺激不同时间的溶菌酶的表达模式。但在刺激 24 小时后, 多数组织的溶菌酶表达水平都呈上调趋势。说明 FcLyz 的表达受到病原感染的调控。

由于溶菌酶在大肠杆菌中表达时, 形成不溶的包涵体, 需要对包涵体进行变性和复性处理。我们采用变性条件下亲和层析的方法, 得到了纯化的重组溶菌酶。然后再采用梯度透析的方法逐步去除脲, 得到了可溶状态的重组溶菌酶。在 SDS-PAGE 检测重组表达蛋白时, 发现重组蛋白分子量大于理论值。有文献报道, 一些含有 His tag 的融合蛋白在 SDS-PAGE 检测时其分子量确实大于理论值, 造成这一现象的原因目前尚不完全清楚^[30,31]。但是当组氨酸标签被切掉后, 重组蛋白的分子量降低, 和预期的蛋白分子量大小相当^[22]。重组表达的 rFcLyz 对革兰氏阳性菌的最小抑菌浓度达到 3.43 $\mu\text{mol/L}$, 对革兰氏阴性菌的抑菌浓度活性较低。

综上所述, 中国明对虾的溶菌酶在血细胞、心脏、肝胰腺、胃、鳃和肠等组织中有较低水平的组成性表达, 当对虾受到病原微生物感染时, 溶菌酶的表达上调。重组表达的溶菌酶具有较高的抗革兰

氏阳性菌的活性。这些数据说明溶菌酶作为一种效应分子, 在对虾抗细菌感染的免疫防御反应中起着重要作用。

REFERENCES

- [1] Hultmark D. Insect lysozymes. *EXS*, 1996, **75**: 87-102.
- [2] Prager EM, Jolles P. Animal lysozymes c and g: an overview. *EXS*, 1996, **75**: 9-31.
- [3] Beintema JJ, Terwisscha van Scheltinga AC. Plant lysozymes. *EXS*, 1996, **75**: 75-86.
- [4] Holtje JV. Bacterial lysozymes. *EXS*, 1996, **75**: 65-74.
- [5] Fastrez J. Phage lysozymes. *EXS*, 1996, **75**: 35-64.
- [6] Qasba PK, Kumar S. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1997, **32**(4): 255-306.
- [7] Jolles J, Jolles P. The lysozyme from *Asterias rubens*. *Eur J Biochem*, 1975, **54**(1): 19-23.
- [8] Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, et al. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *Eur J Biochem*, 1999, **259**(1-2): 456-461.
- [9] Nilsen IW, Myrnes B. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes. *Gene*, 2001, **269**(1-2): 27-32.
- [10] Bachali S, Jager M, Hassanin A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol*, 2002, **54**(5): 652-664.
- [11] Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 2003, **316**: 187-195.
- [12] de-la-Re-Vega E, Garcia-Galaz A, Diaz-Cinco ME, et al. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, **20**(3): 405-408.
- [13] Zheng QM, Ye X, Bai JJ, et al. Expression of *Penaeus monodon* lysozyme gene in prokaryocyte system and evaluation of its lytic activity. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **29**(1): 20-24.
郑清梅, 叶星, 白俊杰, 吴锐全, 劳海华, 罗建仁. 斑节对虾溶菌酶基因的原核表达与产物活性检测. 水产学报, 2005, **29**(1): 20-24.
- [14] Du XJ, Zhao XF, Wang JX. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol Immunol*, 2007, **44**(6): 1085-1094.
- [15] Kuhelj R, Dolinar M, Pungercar J, et al. The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur J Biochem*, 1995, **229**(2): 533-539.
- [16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the

- assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680–685.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [18] Liu YC, Li FH, Dong B, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol*, 2007, **44**(4): 598–607.
- [19] Sun J, Wang L, Wang B, *et al.* Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, Nov14: [Epub ahead of print].
- [20] Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, *et al.* Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1724**(1-2): 86–93.
- [21] Luo T, Yang H, Li F, *et al.* Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 2006, **30**(7): 607–617.
- [22] Sun, YD, Fu LD, Jia YP, Du XJ, Wang Q, Wang YH, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol Immunol*, 2008, **45**: 348–361.
- [23] Zhao ZY, Yin ZX, Weng SP, *et al.* Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, **22**: 520–534.
- [24] Kang CJ, Wang JX, Zhao XF, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, **16**(4): 513–525.
- [25] Kang CJ, Xue JF, Liu N, *et al.* Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol*, 2007, **44**(7): 1546–1554.
- [26] Zhang J, Li F, Wang Z, *et al.* Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J Biotechnol*, 2007, **127**(4): 605–614.
- [27] Liu F, Liu Y, Li F, *et al.* Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar Biotechnol* (NY), 2005, **7**(6): 600–608.
- [28] Pan D, He N, Yang Z, *et al.* Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol*, 2005, **29**(2): 103–112.
- [29] Burge EJ, Madigan DJ, Burnett L E, *et al.* Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, **22**(4): 327–339.
- [30] Tang WH, Qiu ZL, Wang ZY, *et al.* Expression of a rice cDNA c73 in *E. coli* cells and purification of its fusion protein. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1999, **25**(4): 401–407.
- 唐威华, 仇子龙, 王宗阳, 张景六, 洪孟民. 水稻 cDNAc73 片段在大肠杆菌中的表达及其产物的纯化. *植物生理学报*, 1999, **25**(4): 401–407.
- [31] Niu X, Guiltinan M J. DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(23): 4969–4978.