

# 海刺参 i 型溶菌酶基因的重组表达及抑菌谱分析

王秀霞, 丛丽娜, 王丹, 杨西建, 朱蓓薇

大连工业大学生物与食品工程学院, 大连 116034

**摘要:** 将本实验室已分离到的海刺参 (*Stichopus japonicus*) i 型溶菌酶的基因(GenBank Accession No. EF036468)亚克隆进原核表达载体 pET32a(+)中, 构建重组质粒 pET32a(+)-SjLys, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS。阳性克隆子经诱导表达、亲和纯化和透析复性, 得到了酶活力为 19.2 U/mg 的重组 SjLys (rSjLys), 并对 rSjLys 进行了抑菌谱测定。结果表明, rSjLys 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用, 尤其对常见的海洋致病菌副溶血弧菌和铜绿假单胞菌具有很强的抑菌活性。更为显著的结果是, rSjLys 经 100°C、40 min 加热处理后, 失活的 rSjLys 对革兰氏阳性菌和阴性菌的抑菌能力高于 rSjLys 的 9%~25%。上述结果表明, 海刺参溶菌酶是一种具有糖苷酶活性和非酶抑菌活性的特殊的 i 型溶菌酶, 且具有很广的抑菌活性, 在海刺参机体先天免疫系统中是一个重要的效应分子。

**关键词:** 海刺参, 溶菌酶, 重组表达, 抗菌活性

## Recombinant expression and antibacterial activity of i-type lysozyme from sea cucumber *Stichopus japonicus*

Xiuxia Wang, Lina Cong, Dan Wang, Xijian Yang, and Beiwei Zhu

School of Biology and Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

**Abstract:** The cDNA of an i type lysozyme was cloned from *Stichopus japonicus* (named as SjLys). The DNA fragment of the mature SjLys was subcloned into expression vector of pET-32a (+) to construct the recombinant plasmid of pET32a (+)-SjLys. The recombinant plasmid was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS and induced by isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG). The recombinant protein expressed as inclusion bodies was denatured, partially purified and refolded to be an active form. The bacteriolytic activity of recombinant protein purified by the metal-chelating was 19.2 U/mg. The antibacterial activity of the purified recombinant SjLys (rSjLys) was analyzed. The rSjLys protein displayed inhibitive effect on the growth of the tested Gram-positive and Gram-negative bacteria. In particular, rSjLys had a strong inhibitive activity on *Vibrio parahaemolyticus* and *Pseudomonas aeruginosa*, both the most common pathogenic bacteria in the marine animals. The heat-treated rSjLys exhibited more potent activities against all tested bacteria. These results indicated that the *S. japonicus* lysozyme was the enzyme with combined enzymatic (glycosidase) and non-enzymatic antibacterial action, and it had a wide antibacterial spectrum. Therefore, it is suggested that the *S. japonicus* lysozyme should be one of the important molecules against pathogens in the innate immunity of sea cucumbers.

**Keywords:** sea cucumbers, lysozyme, recombinant expression, lytic activities

**Received:** August 14, 2008; **Accepted:** December 9, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30571449), and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program)(No. 2006CB708210).

**Corresponding author:** Lina Cong. Tel: +86-411-86323262; +86-411-86324521; Fax: +86-411-86323646; E-mail: congln@dlpu.edu.cn  
Beiwei Zhu. E-mail: zhubeiwei@163.com

国家自然科学基金(No. 30571449), 国家重点基础研究发展规划项目(“973 项目”)(No. 2006CB708210)资助。

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-乙酰葡萄糖胺之间的 $\beta$ -1, 4 糖苷键的水解,导致细胞裂解,从而使细菌死亡。它广泛存在于自然界动植物和微生物的组织、体液及分泌物中,在生物机体的免疫防御系统中发挥重要作用。对于缺少特异性免疫的无脊椎动物而言,抗菌效应尤为重要,而无脊椎动物组织中分布最广泛的抗菌蛋白即是溶菌酶<sup>[1]</sup>。不仅如此,溶菌酶还作为无脊椎动物的一种重要的消化酶,通过分解生存环境中的微生物来获得生长所需的部分 C、N 源<sup>[2]</sup>。

目前,溶菌酶大致被分为以下 6 类: c 型溶菌酶、g 型溶菌酶、植物溶菌酶、细菌溶菌酶、噬菌体溶菌酶和无脊椎动物溶菌酶(又称 i 型溶菌酶)<sup>[3]</sup>。近年来随着人们把开发新药和功能性食品的目光投向海洋,对 i 型溶菌酶的研究兴趣也日益高涨,相继在海洋贝类<sup>[4]</sup>、虾<sup>[5,6]</sup>、海星<sup>[7]</sup>、海胆<sup>[8]</sup>中发现。本实验室已从海刺参(*Stichopus japonicus*)中克隆得到一种 i 型溶菌酶(SjLys)<sup>[9]</sup>。该溶菌酶存在于海刺参的各个组织,甚至在海刺参的无细胞的腔肠液体中也发现了溶菌酶<sup>[10]</sup>。

溶菌酶由于其特性被越来越广泛地应用于医药、生物技术、食品等领域中。目前溶菌酶主要从蛋清中提取,但由于该方法来源及产量有限,因此采用基因重组技术,使用原核或真核表达系统生产溶菌酶是解决市场需求的有效途径。目前对水产动物溶菌酶基因工程研究还较少。本研究对海刺参 SjLys 的成熟蛋白基因进行扩增,构建重组质粒 pET32a(+)-SjLys,转化至大肠杆菌中诱导表达,并对纯化后的 SjLys 进行酶活力及抗菌活性的检测,其结果为进一步研究海刺参的免疫防御机制和消化机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 购自天根生物技术公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa Biotechnology(大连)公司;表达载体 pET32a(+)-SjLys 购自 Novagen 公司

#### 1.1.2 试剂与工具酶

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA ladder Marker、蛋白低分子量 Marker、TaKaRa one step RNA PCR Kit (AMV)质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa Biotechnology(大连)公司;异丙基硫代 $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)和 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;HisTrap HP 购自 GE Healthcare 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 海刺参溶菌酶(SjLys)成熟肽基因的扩增

将新鲜海刺参肠取样,根据 Trizol 试剂说明抽提总 RNA。参照已发表的海刺参溶菌酶 cDNA<sup>[9]</sup>和表达载体 pET32a(+)-SjLys 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性引物 HS1-5 和 HS1-6,引物两端分别引入 *Nco* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点(下划线表示)。HS1-5: 5'-TGGTCCATGGC ATGCAAGTTC-3', HS1-6: 5'-TTGCGAAGCTTTCA GTTGTTGC-3',使用 TaKaRa one step RNA PCR Kit(AMV)进行 RT-PCR。PCR 循环参数为: 50°C 30 min, 94°C 2 min; 94°C 30 s, 40°C 30 s, 72°C 1.5 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。反应结束后,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因,并将目的条带回收纯化,备用。

#### 1.2.2 重组表达质粒的构建

扩增产物回收纯化后,16°C 过夜连接至 pMD18-T 载体,转化受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,测序筛选得到阳性克隆。用 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切提取出的重组质粒,回收目的基因片段,并定向克隆到经同样限制性内切酶处理的 pET32a(+)-SjLys 载体中,构建重组表达质粒 pET32a(+)-SjLys。将 pET32a(+)-SjLys 和 pET32a(+)-SjLys 同时转化至 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中,并在含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 琼脂平板培养基上 37°C 过夜培养。分别挑取单菌落接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,37°C 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒,PCR 及酶切检测鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组 pET32a(+)-SjLys 进行序列测定,验证重组质粒读码框的正确性。

#### 1.2.3 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

挑取重组质粒 pET32a(+)-SjLys 和阴性对照载体 pET32a(+)-SjLys 转化的阳性菌接种于含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 TB 液体培养基中,37°C 振荡培养过夜。次日以

1:50 稀释扩培, 37°C 振荡培养至  $OD_{600}$  达 0.4~0.6, 加入 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L)30°C 诱导培养 4 h。SDS-PAGE<sup>[11]</sup>检测重组表达蛋白是否表达。

#### 1.2.4 重组 S<sub>j</sub>Lys 表达产物的纯化和复性

收集诱导后表达菌体, 重悬于 20 mL 1×PBS (pH 7.4) 缓冲液中, 再加入 10 μL 1% Triton 100。置冰浴中超声裂解, 功率 300 W, 超声 1 s, 静置 3 s, 至不再粘稠。4°C、10 000 r/min 离心 15 min, SDS-PAGE 检测。沉淀用缓冲液 I (50 mmol/L Tris·HCl pH 8.5、1 mmol/L EDTA 缓冲液、100 mmol/L NaCl、6 mol/L 盐酸胍)和 15 μL DTT 溶解过夜。4°C、10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。-20°C 保存备用。

准备 1 mL HisTrap HP column, 用超过 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡。将以上处理的样品以约 1 mL/min 的流速上样。然后结合缓冲液洗柱至  $A_{280}$  值恒定不变。用洗脱液(20 mmol/L 磷酸钠溶液、500 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)洗脱 10 倍柱体积, 并于 280 nm 波长下检测, 收集洗脱液。所得分离纯化后的变性重组蛋白, 依次在含有 8、6、4、3、2、1 和 0 mol/L 尿素的 50 mmol/L Tris·HCl 缓冲液(pH 8.0)中透析各 4 h (4°C), 目的将裂解液中的尿素替换出来。复性后样品经过离心, 获得重组 S<sub>j</sub>Lys。比浊法测定复性后的重组 S<sub>j</sub>Lys 活力<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.5 S<sub>j</sub>Lys 成熟蛋白的活性及抑菌谱测定

将重组 S<sub>j</sub>Lys 于 100°C 作用 0~60 min, 分别于 0、10、20、30、40、50、60 min 取样, 比浊法<sup>[11]</sup>测定溶菌酶活力。分别选革兰氏阳性菌, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)、以及革兰氏阴性菌, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、志贺菌(*Shigella* spp.)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)作为试验菌, 管碟法<sup>[13]</sup>检测 S<sub>j</sub>Lys 抗菌活性。取 100 μL 以上所选菌液(菌浓度  $2.9 \times 10^9$  CFU/mL, 稀释倍数  $10^{-4}$ )于牛肉膏蛋白胨培养基中涂匀后, 放入无菌牛津杯, 于牛津杯中加入重组 S<sub>j</sub>Lys 酶液和热处理后失活的重组 S<sub>j</sub>Lys 酶液 100 μL (蛋白含量约 10 μg), 37°C 过夜培养, 测量抑菌圈。

## 2 结果与分析

### 2.1 S<sub>j</sub>Lys 基因的扩增与重组表达质粒的构建

参照海刺参溶菌酶的 cDNA 序列, 设计表达特

异性引物 HS1-5 和 HS1-6, 其 5'端和 3'端分别含有 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点, 经 RT-PCR 得到了长度约 400 bp 的扩增产物(图 1), 与预期大小基本一致。将 S<sub>j</sub>Lys 的 PCR 扩增产物用限制性内切酶 *Nco* I/*Hind* III 双酶切, 连接到经过同样酶切的 pET-32a(+)质粒上, 转化 *E. coli* DH5α。经 PCR 和酶切鉴定, 筛选了 4 个单菌落, PCR 检测结果都呈现出预期片段约 400 bp 的 PCR 条带, 说明这些菌株含有 pET-32a(+)-S<sub>j</sub>Lys 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, pET-32a(+)-S<sub>j</sub>Lys 重组质粒构建正确(图 2)。

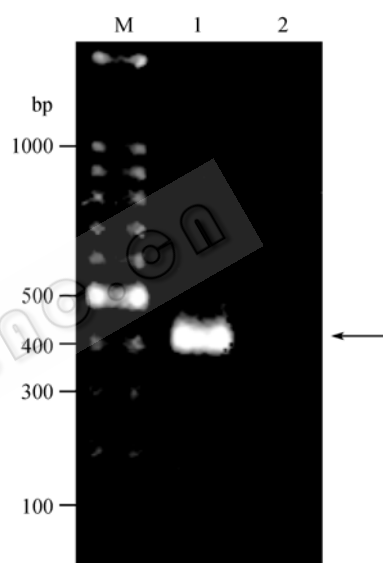


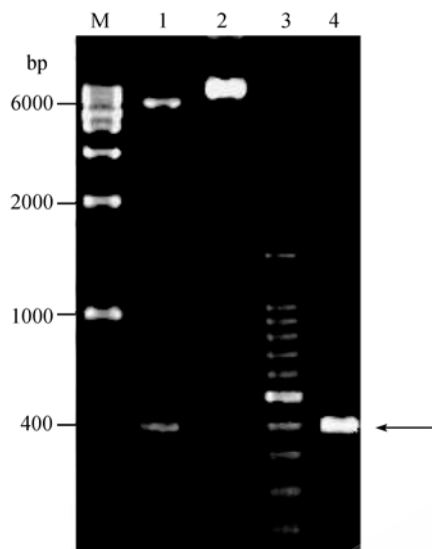
图 1 PCR 扩增 S<sub>j</sub>Lys 成熟肽序列

Fig. 1 Amplification of S<sub>j</sub>Lys by PCR. M: 100 bp DNA ladder marker; 1: amplification of S<sub>j</sub>Lys; 2: negative control.

### 2.2 S<sub>j</sub>Lys 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达、纯化及复性

将提取出的 pET-32a(+)-S<sub>j</sub>Lys 重组表达质粒和阴性对照 pET-32a(+), 转化至 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 中, 小规模诱导表达。12% SDS-PAGE 检测显示, 诱导后的样品在约 18.3 kD 左右比空白载体对照和诱导前对照明显多出 1 条特异带, 其分子量和理论值相吻合, 证明了重组 S<sub>j</sub>Lys 在大肠杆菌中得到表达。经软件 Bandscan 5.0 的分析, 目的蛋白表达量大约为 20.5%。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。经过 12% 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,

说明该目的蛋白表达形成了包涵体。经过方法中描述的包涵体变性、纯化处理后,得到了纯化后的重组 SjlYs (图 3)。采用 Bradford 方法<sup>[14]</sup>分别测定诱导表达后和纯化后的蛋白含量,根据所测得的蛋白含量,计算得到重组 SjlYs 的实际得率为 13%。并对纯化得到的重组 SjlYs 进行复性处理,比浊法测定复性后的重组 SjlYs 和阴性对照 pET-32a(+)/*E. coli* BL21(DE3)pLysS 溶菌酶活力,结果显示复性后的重组 SjlYs 酶活力为 19.2 U/mg,而 pET-32a(+)/*E. coli* BL21(DE3)pLysS 无溶菌酶活力。

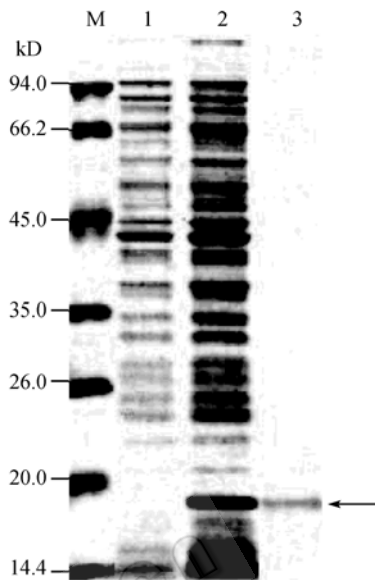


**图 2 重组质粒 pET32a(+)-SjlYs 酶切及 PCR 鉴定**  
 Fig. 2 Identification of recombinant pET32a (+)-SjlYs plasmid. M: 1 kb DNA ladder marker; 1: digested product by *Nco* I and *Hind* III; 2: pET32a (+)-SjlYs; 3: 100 bp DNA ladder marker; 4: PCR product.

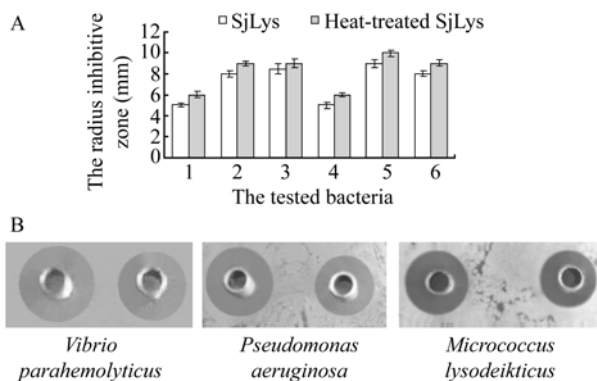
**2.3 SjlYs 成熟蛋白的抑菌活力测定**

经对方法 1.2.6 中选取的 7 个重组 SjlYs 样品进行溶菌酶酶活力测定发现,加热 10 min 后酶活减少了 10%,加热 20 min 后酶活减少了 30%,而加热 40 min 时溶菌酶酶活完全丧失。因此,取重组 SjlYs 和热处理 40 min 后失活的 SjlYs 重组蛋白,通过管碟法测定 2 个样品对 6 种革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的抑菌活性。结果发现,该重组 SjlYs 对革兰氏阴性菌和阳性菌均有抑制作用,尤其对海产品中常见的革兰氏阴性致病菌副溶血弧菌和铜绿假单胞菌有明显的抑制作用。热处理失活后的 SjlYs 重组蛋白仍然具有抑菌活性,而且抑菌能力要比热处理前的 SjlYs 提高 9%~25%(图 4)。而用阴性对照 pET-32a(+)/*E. coli* BL21(DE3)pLysS 测定其对 6 种革兰氏

阴性菌和革兰氏阳性菌的抑菌活性,结果均无抑菌能力。上述结果说明,该重组 SjlYs 不仅具有很广的抑菌谱,而且还同时具有酶活性和非酶抗菌活性。



**图 3 重组表达 SjlYs 的表达与纯化的 SDS-PAGE 检测**  
 Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of SjlYs from pET-32a (+)-SjlYs/*E. coli* BL21 (DE3)pLysS. M: standard protein; 1: the non-induced strain; 2: same strain induced by IPTG; 3: purified SjlYs by HisTrap HP. An arrow indicates target protein.



**图 4 重组 SjlYs 和热处理失活后 SjlYs 对革兰氏阳性菌和阴性菌的抗菌谱测定**

Fig. 4 Antimicrobial activities of the recombinant SjlYs and heat-treated recombinant SjlYs against Gram-positive and Gram-negative bacteria. (A) The tested bacteria include: 1, *Staphylococcus aureus*; 2, *Micrococcus lysodeikticus*; 3, *Escherichia coli*; 4, *Shigella* spp.; 5, *Vibrio parahemolyticus*; 6, *Pseudomonas aeruginosa*. For the heat-treated sample, the recombinant SjlYs was incubated for 40 min at 100°C. 100 μL (10 μg) of recombinant sample was applied to each treatment and values were shown as means ±S.E. n=3. (B) Three examples were taken from lysis plates. The left and right halos in each plate indicate the recombinant SjlYs with and without heat treatment against the specific strain, respectively.

### 3 讨论

溶菌酶是一种具有杀菌和免疫功能的效应分子。它可选择性地分解微生物细胞壁的同时不破坏其他组织,且本身无毒无害,因而它是一种天然的安全性能很好的杀菌剂、防腐剂,可广泛应用于食品防腐、医药制剂、日用化工等行业。目前溶菌酶主要从蛋清中提取,由于来源有限,生产工艺复杂,溶菌酶产量十分有限,价格居高不下,难以满足越来越大的市场需求。因此用基因工程手段表达溶菌酶成为很重要的手段。本研究将编码海刺参溶菌酶成熟肽的 cDNA 片段克隆到大肠杆菌表达载体 pET32a(+)中,构建了含有溶菌酶基因的重组质粒 pET32a(+)-SjLys。将该重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)pLysS,经 IPTG 诱导后宿主菌产生了以包涵体形式存在的重组目的蛋白。通过对重组蛋白进行序列和 SDS-PAGE 分析,发现表达的重组蛋白为海刺参溶菌酶。海刺参溶菌酶基因的成功表达,为制备抗体进一步研究其在海刺参免疫系统中的地位和作用做了初步探索,同时也为该基因在海刺参疾病防治中的应用奠定了基础。

本试验选用的原核表达载体为 pET-32a(+),由于其本身含有 6 个组氨酸组成的组氨酸“标签”,所以表达的目的蛋白可以通过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析而纯化,大大简化了纯化过程和难度。在大肠杆菌中对高等生物功能基因进行重组表达时,重组蛋白往往以无活性的包涵体形式存在。为了获得有活性的重组蛋白,需要将包涵体中的重组蛋白变性溶解,然后再加以复性,使重组蛋白分子重新折叠形成正确的空间结构<sup>[15,16]</sup>。SjLys 分子内含有 10 个半胱氨酸残基,大肠杆菌在合成重组溶菌酶时,这些半胱氨酸会形成一些链间和链内的非活性二硫键,使包涵体结构致密。分离纯化时,先利用高浓度的变性剂(6 mol/L 盐酸胍)将重组溶菌酶中的二硫键完全打开,使绝大部分重组溶菌酶蛋白溶解并充分变性。经过金属螯合柱纯化后的重组溶菌酶蛋白中含有高浓度的变性剂,为了去除变性剂并使重组溶菌酶中的二硫键正确形成,本试验把纯化后的重组溶菌酶置于缓冲液中,利用梯度稀释透析法缓慢去除高浓度的蛋白变性剂(尿素),从而保证变性蛋白正确复性,形成具有生物活性的重组溶菌酶蛋白<sup>[17]</sup>。

溶菌酶对革兰氏阳性菌( $\text{G}^+$ )与革兰氏阴性菌( $\text{G}^-$ )的溶菌作用,由于两者细胞壁中肽聚糖含量不同而存在差异。 $\text{G}^+$ 细胞壁含 80%肽聚糖,而  $\text{G}^-$ 细胞壁只有在内壁层含有少量肽聚糖,因此,溶菌酶能有效杀死  $\text{G}^+$ 菌,而对  $\text{G}^-$ 细胞破坏很小。而本研究显示,SjLys 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有抑菌活性,这是不同于其他溶菌酶的一个显著特性,尤其是该溶菌酶对副溶血弧菌有很强的抑制作用。副溶血弧菌是海产品中最常见的致病菌,因此,该溶菌酶的研究在水产品养殖方面具有很重要的意义。SjLys 对革兰氏阴性菌具有明显的抑菌作用,说明了溶菌酶可能具有与  $\text{G}^-$ 细胞壁中的脂多糖相互作用的能力<sup>[17]</sup>。

人们普遍认为溶菌酶的抑菌特性依赖于它们的糖苷酶活性,但最近的一些研究表明,变性的溶菌酶缺乏糖苷酶活力却依然能抑制细菌生长。该非酶抑菌功能已发现存在于鸡蛋清、人、T4 和 i 型溶菌酶<sup>[18,19]</sup>中。本研究中重组表达的 SjLys 的抑菌实验结果表明,该酶不仅具有糖苷酶活性,而且还具有非酶抑菌活性,是一种双功能特性的 i 型溶菌酶。Ibrahim 等曾经证明脊椎类动物中的 c 型溶菌酶的非酶抗菌活性主要是由双螺旋肽协同作用<sup>[19]</sup>。Ibrahim 等研究预测,变性溶菌酶所具有的抑菌活性可能是因为溶菌酶的 C 端区域在起作用<sup>[20]</sup>。而 Masschalck 等则认为溶菌酶的非酶抑菌活性取决于其高浓度的阳离子特性<sup>[21]</sup>。对非脊椎类动物中的失稳酶-溶菌酶(Destabilase-Lysozyme, DL)的非酶抗菌活性研究则表明,该活性主要是由单个的螺旋肽而非多螺旋肽协同起作用,这是不同于 c 型溶菌酶的<sup>[20]</sup>。DL 是一种来自欧洲医蛭的失稳酶(Destabilase),该酶既具有异构肽活性,又具有糖苷酶活性<sup>[22]</sup>。本研究曾对海刺参溶菌酶蛋白保守结构域进行分析,结果表明该酶与失稳酶相似性最高,它和失稳酶的三级结构模型也极其相似<sup>[9]</sup>。因此,本研究作者推测重组 SjLys 的非酶抗菌作用机制可能是由单个螺旋肽在起作用;而重组 SjLys 的非酶抗菌活性的提高,可能是由于 SjLys 加热后使其该螺旋肽区域或某一特定结构域的构象发生了变化。对其机理的研究还需进一步从海刺参溶菌酶的结构和功能上进行验证。海刺参是海洋无脊椎动物的典型代表,近年来对海刺参的研究多集中在养殖、产品深加工和药用活性方

面, 而从基因水平研究其体内所含功能蛋白的报道则较少。本研究对海刺参体内的溶菌酶基因进行研究, 为今后从继续高效表达海刺参内所含的低密度功能蛋白提供了实践经验, 为进一步研究海参的生长、新陈代谢以及自溶现象提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Beck G, Habicht GS. Immunity and the invertebrates. *Sci Am*, 1996, **275**(5): 60–66.
- [2] 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.
- [3] Jolles J, Jolles P. The lysozyme from *Asterias rubens*. *Eur J Biochem*, 1975, **54**(1): 19–23.
- [4] Liu M, Zhang S, Liu Z, *et al.* Characterization, organization and expression of *AmphiLysC*, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheris tsingtauen*. *Gene*, 2006, **367**: 110–117.
- [5] Sotelo-Mundo R, Islas-Osuna M, de-la-Re-Vega E, *et al.* cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, **15**(4): 325–331.
- [6] 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.
- [7] Bachali S, Bailly X, Jolles J, *et al.* The lysozyme of the starfish *Asterias rubens*. A paradigmatic type i lysozyme. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(2): 237–242.
- [8] Stabili L, Licciano M, Pagliara P. Evidence of antibacterial and lysozyme-like activity in different planktonic larval stages of *Paracentrotus lividu*. *Mar Biol*, 1994, **119**(4): 501–505.
- [9] Yang XJ, Cong LN, Lu ML, *et al.* Characterization and structure analysis of a gene encoding i-type lysozyme from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2007, **23**(7): 542–547.  
杨西建, 丛丽娜, 路美玲, 等. 海参 i 型溶菌酶基因及其编码产物的结构特点. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, **23**(7): 542–547.
- [10] Canicatti C, Roch P. Studies on *Holothuria polii* (*Echinodermata*) antibacterial proteins. I. Evidence for and activity of a coelomocyte lysozyme. *Cell Mol Life Sci*, 1989, **45**(8): 756–759.
- [11] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680–685.
- [12] Zhang SZ. *Enzyme Preparation Industry*. Beijing: Science Press, 1998.
- [13] Bu XJ, Du XJ, Zhou WJ, *et al.* Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(5): 723–732.  
卜兴江, 杜欣军, 周文杰, 等. 中国明对虾溶菌酶基因克隆、重组表达与性质分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(5): 723–732.
- [14] Bradford M. 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.
- [15] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**(5): 497–501.
- [16] Swietnicki W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**(4): 367–372.
- [17] Ohno N, Morrison D. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 4434–4441.
- [18] Zhao J, Song L, Li C, *et al.* Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Mol Immunol*, 2007, **44**(6): 1198–1208.
- [19] Ibrahim H, Thomas U, Pellegrini A. A helixloop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 43767–43774.
- [20] Ibrahim H, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett*, 2001, **506**: 27–32.
- [21] Masschalck B, Michiels C. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 2003, **29**: 191–214.
- [22] Zavalova L, Baskova I, Lukyanov S, *et al.* Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1478**(1): 69–77.