

三疣梭子蟹 C-型凝集素的原核表达和活性检测

于金红 潘鲁青*

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要 通过 RT-PCR 扩增三疣梭子蟹 C-型凝集素(C-type lectin like-domain protein, CTLD)基因序列,将目的基因克隆入质粒 pET32a,构建原核表达重组质粒 pET32a-CTLD。将重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 中,通过 IPTG 诱导 CTLD 的表达,对其表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。用 His GraviTrap Ni 亲和层析柱及超滤离心管纯化目的蛋白,并对其进行活性检验。结果表明,构建得到 CTLD 基因的原核表达载体,双酶切鉴定得到与预期片段相符的外源基因插入片段,经测序与目的序列完全一致;诱导表达出相对分子质量(M)39 600 的目的蛋白,经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,融合蛋白成功表达;重组 C-型凝集素对兔的红细胞没有明显的凝集作用,但对小鼠红细胞的凝集效价是 2^2 ,而对所选 5 种细菌的凝集作用存在差异,其中对大肠杆菌具有明显的凝集作用,而对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌和金黄色葡萄球菌均无凝集现象。本研究结果为进一步研究 C-型凝集素在免疫防御中的作用与地位提供依据。

关键词 三疣梭子蟹 C-型凝集素 原核表达 活性检测

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0058-06

Prokaryotic expression of C-type lectin like-domain protein gene of *Portunus trituberculatus* and activity analysis of recombinant protein

YU Jin-hong PAN Lu-qing*

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The total RNA extracted from the hemocyte sample of *Portunus trituberculatus* was used to amplify the DNA sequence encoding an open reading frame for C-type lectin like-domain protein (noted CTLD) by RT-PCR. The sequence was then cloned into pMD18-T vector and was sequenced. The recombinant plasmid was digested by *Bam*H I and *Xho* I. The target gene was subsequently inserted into the pET-32a(+) vector, which was also digested with the corresponding restriction endonuclease. The recombinant plasmid p32a-CTLD was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and then induced by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). The fusion protein was purified through His-Band resin chelating chromatography and Amicon Ultra centrifugal filter devices, and agglutination activity was assayed finally. Results showed that the CTLD recombinant plasmid was successfully obtained by double enzyme identification.

国家 863 计划项目(2012AA10A409)资助

* 通讯作者. panlq@ouc.edu.cn, Tel:(0532) 82032963

收稿日期:2012-09-08;接受日期:2013-01-17

作者简介:于金红(1986-),女,在读硕士研究生,主要从事水产动物环境生理学研究。E-mail:jinhong1128@126.com, Tel:(0532) 82031827

The inserted fragment was confirmed correctly by sequencing. SDS-PAGE and western-blot analysis showed that the fusion protein was successfully expressed. The fusion protein of about M39600 was successfully induced, which was identified by SDS-PAGE and western blot analysis. For the agglutination assay, no obvious agglutination was detected on the rabbit erythrocytes, while the agglutination titer of the mice erythrocytes was 2^2 . No obvious agglutination was observed when *Vibrio alginolyticus*, *V. harueyi*, *V. anguillarum*, *Staphylococcus aureus* were incubated with the recombinant protein. However, mass agglutination was observed after *E. coli* was incubated with the recombinant protein for 1h. This study provides a good foundation for further studies on the function of C-type lectin.

KEY WORDS *Portunus trituberculatus* C-type lectin like-domain protein
Prokaryocyte expression Activity analysis

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 是我国重要的经济甲壳动物,近年来由于病害频发,严重制约了三疣梭子蟹养殖业健康持续发展,而传统的病害防治策略主要以抗生素和化学药物为主,由此造成病原的耐药性和食品安全等问题日益突出。目前甲壳动物的免疫机制尤其是凝集素免疫功能的研究已成为世界研究的热点。甲壳动物凝集素分为 Calnexin、C-、L-、P-、I-、R-和 S-型凝集素等(Janeway *et al.* 2002),其中 C-型凝集素(C-type lectin)作为先天免疫反应中模式识别受体的一类凝集素(Hall *et al.* 1974),在 Ca^{2+} 存在下能特异地识别外源微生物表面的糖类物质,并与之发生专一性的、非共价的可逆结合,引起一系列免疫反应从而有效地抵抗病原微生物的入侵(Luo *et al.* 2003、2006; Zhao *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009; Song *et al.* 2010a)。

近年来,许多学者采用原核表达的方法重组甲壳动物 C-型凝集素研究其免疫功能(Zhang *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011),目前有关三疣梭子蟹 C-型凝集素的免疫防御的作用尚不十分清楚,也未见其 C-型凝集素重组表达的研究,这在很大程度上制约了三疣梭子蟹免疫防治工作。本研究扩增了三疣梭子蟹 C-型凝集素基因,构建了原核表达的重组质粒,实现了在大肠杆菌中的表达,并进行了活性检测,为三疣梭子蟹凝集素免疫机制的研究提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

实验时间为 2012 年 4 月,所用三疣梭子蟹购于山东省青岛市南山水产批发市场,体色正常,健康活泼,全甲宽 12.2 ± 0.58 cm,甲长 5.7 ± 0.19 cm。表达载体 pET-32a 为本研究室保存。琼脂糖凝胶回收试剂盒及低分子量预染蛋白 Marker 均为 TaKaRa 公司产品;质粒提取试剂盒、Anti-His 抗体(一抗)、羊抗鼠 IgG-HRP(二抗)和 Pro-light HRP 化学发光检测试剂均为天根公司产品;His GraviTrap Ni 亲和层析柱购自美国 GE 公司;超滤离心管(10kD)购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因的 RT-PCR 扩增

根据三疣梭子蟹 C-型凝集素基因(C-type lectin like-domain protein, CTLD)cDNA 序列(GenBank 注册号:EU477491.1)(Kong *et al.* 2008)的开放阅读框和表达载体 pET-32a (+)的多克隆位点的序列设计 1 对特异性引物。上游引物 CTLD-F:5'-CG GGATCCATGACTGGCTTCAGGCTGCTG-3';下游引物 CTLD-R:5'-CG CTCGAGTCTTCTCACAAATCGGACTTACATC-3',其中在上游和下游引物 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线标出)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 目的片段的扩增与回收

将抽取的健康三疣梭子蟹抗凝血淋巴样品在离心管中混匀,于4℃、800g离心,取沉淀的血细胞提取总RNA,反转录合成cDNA作为模板进行PCR扩增。PCR扩增体系为超纯水16 μ l,10 \times Buffer(含Mg²⁺)2.5 μ l,dNTP 2 μ l,上下游引物各1 μ l,模板2 μ l,rTaq 0.5 μ l。PCR扩增产物以1.0%琼脂糖电泳检测分离,回收目的条带。扩增后的CTLD片段连接到克隆载体pMD18-T中测序。

1.2.3 重组质粒 p32a-CTLD 的构建与鉴定

将含有CTLD片段的质粒pMD-CTLD和表达质粒pET-32a(+)大量培养后用质粒提取试剂盒制备质粒,分别用Xho I和BamH I进行双酶切,得到的目的片段切胶回收,在T4 DNA连接酶作用下将CTLD片段与线性pET-32a(+)载体连接,构建重组质粒p32a-CTLD,转化DH5 α 后,利用含Ampicillin(Amp)抗性平板筛选阳性克隆进行菌落PCR、双酶切及测序验证,以确定开放阅读框编码正确。

1.2.4 CTLD 基因的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

提取测序正确的重组质粒p32a-CTLD重新转化BL21(DE3)感受态细胞,构建重组菌株BL21/p32a-CTLD,挑取转化平板上的单克隆接种于LB液体培养基(含Amp 50 μ g/ml)中37℃震荡培养过夜,然后1:100扩培至OD₆₀₀约为0.6时,加入诱导剂IPTG至终浓度为1 mmol/L,低温诱导过夜,以不加诱导剂IPTG的菌株作为阴性对照。4 000 r/min室温离心10min收集菌体,重新悬浮在裂解液1中(20mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,500mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA),超声波破碎。可溶性蛋白存在于离心(10 000g,20min)所得上清液中。按照分子克隆常规方法进行SDS-PAGE电泳检测表达情况。

1.2.5 Western Blot 检测

将阳性菌株表达产物经过SDS-PAGE电泳后,将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC膜)。电转移完成后,NC膜于5%牛奶中封闭1h,然后加anti-His抗体室温孵育1~2h。反应完成后用洗脱液TBST洗脱(3次,每次10min),再加入用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG的溶液中,室温孵育1~2h。一抗、二抗均用封闭液按照说明书上指定比例配制。反应完成后用TBST洗脱3次。Pro-light HRP化学发光检测试剂显色,反应在室温黑暗中进行,显影与定影后照像。

1.2.6 His 标签纯化

使用His标签镍离子亲和层析柱进行蛋白质纯化。先用10ml结合缓冲液(20mmol/L磷酸钠,500mmol/L NaCl,20mmol/L咪唑,pH 7.4)平衡柱子,然后加入含可溶性蛋白的溶液10ml,再用10ml结合缓冲液洗涤,最后加3ml洗脱缓冲液(20mmol/L磷酸钠,500mmol/L NaCl,500mmol/L咪唑,pH 7.4)洗脱,收集洗脱液。添加4ml洗脱液于Amicon Ultra的过滤装置中,将内管套入外管,对称放置离心管,14 000r/min离心(离心10min浓缩4倍)。离心结束后,将内管倒置套在另一个干净的离心管内,3 880r/min离心10min,收集浓缩后的样品即得纯化的目的蛋白。

1.2.7 凝集活性测定

分别在小鼠眼球和兔子耳朵处抽取血液,制成2%红细胞悬浮液。参照戴聪杰等(2002)和Luo等(2006)的方法,进行血细胞凝集实验。取96孔V型微量血凝板,每孔分别加入25 μ l TBS-Ca²⁺(0.14 mol/L NaCl,0.01mol/L Tris-HCl,0.01mol/L CaCl₂; pH=7.4),在第一孔中加入25 μ l重组C-型凝集素样品,混匀后吸取25 μ l第一孔中混合液加入第二孔,以此类推倍比稀释,然后在每孔中加入25 μ l小鼠或兔红细胞悬液,室温孵育1~2h,观察红细胞的沉淀状态以检测目的蛋白的生物学活性。如果红细胞不发生凝集,则在孔内红细胞沉于孔底形成一界限清晰的红色小点;如果发生凝集则红细胞之间形成似网络状扩散的红斑块。以能产生凝集的凝集素最大稀释度的倒数作为此凝集素的效价。

凝菌实验参照Yu等(1999)、Wang等(2007)和Zhang等(2009)的方法,并略作改进。选择革兰氏阴性菌大肠杆菌*Escherichia coli*、溶藻弧菌*Vibrio alginolyticus*、哈维氏弧菌*Vibrio harveyi*、鳃弧菌*Vibrio anguillarum*,革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus*用于凝菌实验。首先用TBS-Ca²⁺(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L CaCl₂,pH=7.5)调节细菌终浓度约为2.5 \times 10⁸个/ml,然后用0.2 μ g/ml的4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)与TBS-Ca²⁺菌悬液室温孵育染菌。取10 μ l上述细菌悬液,加入

25 μ l 重组 C-型凝集素,室温孵育 1h 后,以 BSA 为空白对照,在荧光显微镜下观察细菌的凝集状态。

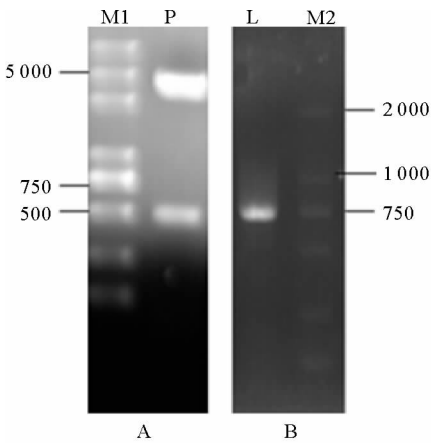
2 结果

2.1 重组质粒 p32a-CTLTD 的构建与验证

由图 1B 可以看出,对重组质粒 p32a-CTLTD 进行菌落 PCR 检验,得到大小约为 742bp 的片段(目的基因开放性阅读框长为 495bp,pET-32a(+)载体通用引物 T7 与 T7 ter 扩增载体片段长为 247bp),送样测序证明开放性阅读框连接正确。由图 1A 可以看出,重组质粒 p32a-CTLTD 双酶切得到大小约为 5 857bp 和 495bp 的片段,大片段为 pET-32a 载体酶切后大小,小片段与基因 CTLTD ORF 大小一致。菌落 PCR、双酶切及测序验证表明,目的基因与表达载体连接成功,可以进行后续实验。

2.2 LvLec 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

图 2 表明,BL21/p32a-CTLTD 重组菌株诱导后,12%SDS-PAGE 凝胶电泳分析显示在 35kD 处出现明显的条带,与预测大小(39.64kD)基本一致,而未加 IPTG 诱导的对照培养物中没有目标条带,说明目的基因实现了在 *E. coli* 中的表达(图 2)。

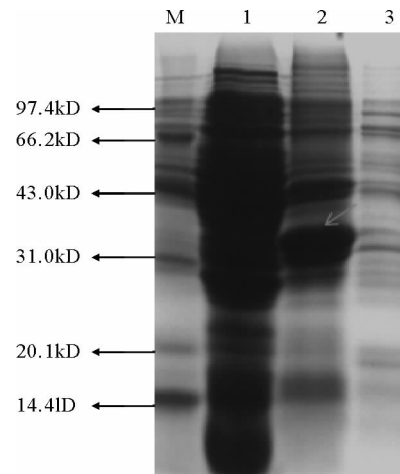


注:M1:DNA Marker DL10000;P:重组质粒 p32a-CTLTD 双酶切;M2:DNA Marker DL2000;L:重组质粒 p32a-CTLTD 菌落 PCR 检测

Note:M1: DNA Marker DL10000;P: p32a-CTLTD digested with *Bam*H I/*Xho* I; M2:DNA Marker DL2000;L: PCR analysis of recombinant plasmid p32a-CTLTD in *E. coli* DH5 α

图 1 重组质粒的菌落 PCR 及限制性酶切验证

Fig. 1 PCR analysis of recombinant plasmid in *E. coli* DH5 α



注:M-Protein Marker;M-预染蛋白;1. 未过柱的重组蛋白;2. 加 IPTG 诱导的 BL21/p32a-CTLTD 菌株;3. 未加 IPTG 诱导的 BL21/p32a-CTLTD 菌株

Lane M: Prestained protein marker. Lane 1: The recombinant protein, non-purified; Lane 2: pET-32a-CTLTD in BL21, non-induced. Lane 3: pET-32a-CTLTD in BL21, IPTG-induced for 4 h. The recombinant protein is indicated by arrowhead

图 2 表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression products

2.3 Western Blot 检测

图 3 免疫印迹结果显示,纯化后的重组蛋白可以特异性地与 anti-His 抗体识别,在 35kD 处有明显的特异性单一条带,与预期大小基本一致,表明该位置蛋白即是带有 His 标签的重组蛋白,从而证明重组蛋白在大肠杆菌中成功表达。

2.4 凝集活性检测

本研究采用小鼠和兔的红细胞,如图 4 所示,实验证明,重组 C-型凝集素对兔的红细胞没有明显的凝集作

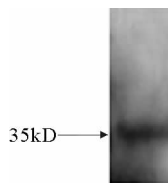
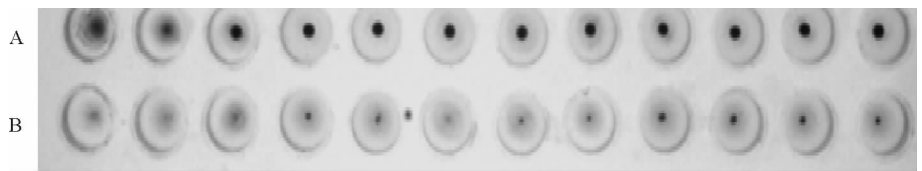


图3 重组表达产物的
Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis
of the expression product



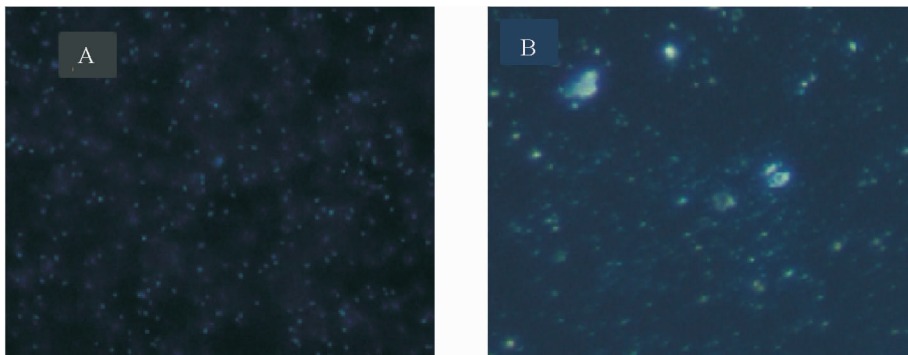
A: 兔子红细胞; B: 小鼠红细胞

A: Mice; B: Rabbit

图4 重组 C-型凝集素 LvLec 对小鼠和兔子红细胞的凝集作用

Fig. 4 The haemagglutination on erythrocyte of mice and rabbit
induced by the recombinant protein

用,但对小鼠红细胞的凝集效价是 2^2 。重组 C-型凝集素对所测试的 4 种菌的凝集作用差异显著,其中对革兰氏阴性菌大肠杆菌有明显的凝集作用,如图 5 所示;而对所选的其他菌种溶藻弧菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌、革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌均无凝集现象。



A: 牛血清白蛋白 (1mg/L); B: 重组蛋白

A: BSA(1mg/L); B: Recombinant protein

图5 重组 C-型凝集素对革兰氏阴性菌大肠杆菌的凝集作用

Fig. 5 The agglutination of Gram-negative bacteria *E. coli* induced by the recombinant protein

3 讨论

大肠杆菌表达系统具有培养周期短、成本低廉、表达量高等优点,是迄今为止应用较为广泛的基因表达系统。pET32a 原核表达载体具有很强的 T7 启动子(Studier 1991),其 N、C 末端分别带有 His 标签,为了获得高水平的基因表达产物,并综合考虑控制转录、翻译、蛋白稳定性等许多因素,选择 pET32a 质粒作为原核表达载体。根据 Kong 等(2008)研究可知,三疣梭子蟹 C-型凝集素基因核苷酸序列 923bp,ORF 区全长 495bp,编码多肽序列 164aa,系统进化分析揭示三疣梭子蟹 C-型凝集素基因(PtLP)具有抗菌功能。本研究构建得到三疣梭子蟹 C-型凝集素基因的原核表达载体,双酶切鉴定得到与预期片段相符的外源基因插入片段,经测序与目的序列完全一致;诱导表达出相对分子质量(M)39 600 的目的蛋白,经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,融合蛋白成功表达。

要实现重组表达蛋白的活性检测,必须获得分离纯化的重组蛋白。目前重组蛋白的分离纯化通常需要运用多种技术手段,应尽量选择高效、除杂质效率高的分离方法(Chang *et al.* 1996),His GraviTrap Ni 亲和层析柱和超滤离心管具有分辨率高、重复性好等优点,本研究采用这种方法成功分离纯化了三疣梭子蟹重组凝集素蛋白。目前许多研究者采用原核生物大肠杆菌表达系统实现了动物凝集素的重组表达,如 Zhang 等(2009)利用原核表达载体 pET30a(+)实现了凡纳滨对虾 C-型凝集素基因的重组表达,重组表达蛋白 rLvLec 对人类、鸡红细胞均无显著的凝集现象,但对大肠杆菌有明显的凝集作用;Chai 等(2008)采用 pET30a(+)载体在大肠杆菌中表达了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* C-型凝集素蛋白,发现重组蛋白在 Ca^{2+} 存在的情况下可凝集

兔的红细胞,没有 Ca^{2+} 则不发生凝集,而且重组蛋白可以结合大部分的革兰氏阴性菌(如大肠杆菌),但对革兰氏阳性菌无凝集活性。另有 Wang 等(2007)研究表明,栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 重组凝集素蛋白 rCFLeC-1 对兔、小鼠、鸡、人类 A、B、O 型红细胞均无显著的凝集现象,但可以凝集革兰氏阴性菌(大肠杆菌),而对阴性细菌(鳗弧菌)无明显的凝集现象;Yu 等(2005)研究显示,从烟草天蛾 *Manduca sexta* 获取的 Immulectin-3 对大肠杆菌具有凝集作用,而不能凝集革兰氏阳性菌 *Staphylococcus aureus*。本研究表明,三疣梭子蟹重组 C-型凝集素对兔的红细胞没有明显的凝集作用,但对小鼠红细胞的凝集效价是 2^2 ,而对所选 5 种细菌的凝集作用存在差异,其中对大肠杆菌具有明显的凝集作用,而对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、鳗弧菌和金黄色葡萄球菌均无凝集现象。这说明重组三疣梭子蟹凝集素对哺乳动物血细胞凝集作用不同,对不同细菌的凝集作用也存在差异。

据梁青龙等(2005)报道,三疣梭子蟹血清凝集素对家兔血细胞有凝集作用,而对大肠杆菌凝集活性较低。结合本研究结果,可知甲壳动物体内的血清凝集素与重组表达凝集素对哺乳动物血细胞的凝集活性不同,对细菌的凝集作用也存在差异。已有研究报道凝集的产生和强度由凝集素的来源和构型、细胞表面的糖分子和构型及二者的对应性所决定(孙 册 1986)。作者认为重组表达三疣梭子蟹凝集素对哺乳动物血细胞及所选细菌的凝集活性不同,可能是因为重组 C-型凝集素与血清凝集素蛋白空间构象等存在差异;同时由于凝集素能识别特定的糖基配体,不同来源红细胞分子中所带的糖基组成及构型存在差异,以及不同微生物表面结构及其分泌的胞外产物不同,使甲壳动物凝集素对不同哺乳动物血细胞和细菌的凝集具有一定的选择性。

参 考 文 献

- 孙 册. 1986. 凝集素. 北京:科学出版社,1-142
- 梁青龙,戴聪杰,陈寅山. 2005. 三种梭子蟹血清凝集素的细胞凝集活性比较. 福建水产,2:13-16
- 戴聪杰,陈寅山. 2002. 日本对虾血清和肌肉提取液凝集活力初步研究. 福建师范大学学报(自然科学版),18(4):81-85
- Chai LQ, Tian YY, Yang DT and 2 others. 2008. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Developmental and Comparative Immunology 32(1):71-83
- Chang YK, Chase HA. 1996. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: The effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. Biotechnology and Bioengineering 49(5): 512-526
- Hall JL, Rowlands DT. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. Biochemistry 13(4): 821-827
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 20:197-216
- Kong HJ, Park EM, Nam BH and 5 others. 2008. A C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fish Shellfish Immunol 25: 311-314
- Luo T, Yang H, Li F and 2 others. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 30: 607-617
- Luo T, Zhang XZ, Shao ZB, Xu X. 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. FEBS Lett 551:53-57
- Song KK, Li DF, Zhang MC and 3 others. 2010. Cloning and Characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicas*. Fish Shellfish Immunol 28: 596-603
- Studier FW. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. Journal of Molecular Biology 219:37-44
- Wang H, Song LS, Li CH and 4 others. 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Molecular Immunology 44(5):722-731
- Wang XW, Zhang HW, Li X and 2 others. 2011. Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish. Fish Shellfish Immunol 30:241-247
- Yu XQ, Gan H, Kanost MR. 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenoloxidase. Insect Biochem Mol Biol 29:585-597
- Yu XQ, Tracy ME, Ling E and 2 others. 2005. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. Insect Biochem Mol Biol 35(4):285-295
- Zhang Y, Qiu LM, Song LS and 8 others. 2009. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 26:183-192
- Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP and 11 others. 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. J Virol 83(1): 347-356