

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)两种热休克蛋白 70(HSP70s)的原核表达、纯化及鉴定*

明建华^{1, 2, 3} 谢 骏² 徐 跑² 戈贤平² 刘文斌³ 叶金云¹

(1. 湖州师范学院生命科学学院 湖州 313000; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081; 3. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081)

提要 采用 PCR 方法扩增团头鲂组成型 HSC70 和诱导型 HSP70 基因完整的编码区片段, 并分别克隆到原核表达载体 pET-22b(+)中, 然后转化大肠杆菌 BL21(DE3), 用 1mmol/L IPTG 在不同温度及时间下进行诱导表达。采用 Ni-NTA His Bind Resins 亲和层析和 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析对目的蛋白进行纯化, 并进行 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析。结果表明, 成功构建了团头鲂两种重组表达质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70, 表达融合蛋白的相对分子量均约为 72kDa, 并能与兔抗人 HSP70 多抗进行特异性结合, 这两种 HSP70s 融合蛋白经纯化后的纯度均达到 95%以上。本实验选择融合蛋白 Ma-HSC70 在 25℃和 Ma-HSP70 在 30℃下分别诱导 7h 作为可溶性表达的最佳条件。

关键词 团头鲂, 热休克蛋白 70, 原核表达, 融合蛋白, 纯化, 鉴定

中图分类号 S917

热休克蛋白(Heat Shock Proteins, HSPs), 又称热应激蛋白(Heat Stress Proteins, HSPs), 是广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物的整个生物界, 进化上高度保守、功能上至关重要的一族蛋白(Kiang *et al*, 1998; Sørensen *et al*, 2003)。其按同源性及分子量大小可分为 3 个主要家族: HSP90 (85—90kDa)、HSP70 (68—73kDa)和小分子量热休克蛋白(16—47kDa) (Basu *et al*, 2002), 其中 HSP70s 是最保守和最重要的一族。HSP70s 主要由 2 种不同的基因所编码, 即组成型 HSC70(Heat shock cognate 70)和诱导型 HSP70 基因, 其中 HSC70 基因在编码区含有内含子, 而 HSP70 基因在编码区不含内含子(Ming *et al*, 2010)。

在水产养殖中, 鱼类对各种环境胁迫的适应性和耐受性在很大程度上与其体内 HSP70s 的数量和表达程度息息相关(Kiang *et al*, 1998)。目前国内外关于鱼类热休克蛋白 70 的研究还较少, 鉴于其在抗病抗

逆中的重要作用, 开展鱼类 HSP70s 表达以及功能方面的研究显得尤为重要。本研究以中国主要的淡水养殖品种之一——团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)为对象, 在前期克隆组成型 Ma-HSC70 和诱导型 Ma-HSP70 cDNA 全序列的基础上(Ming *et al*, 2010), 分别构建了相应的重组表达质粒, 在大肠杆菌 BL21 中进行了优化表达, 并对表达产物的上清进行了纯化和 Western-blotting 验证, 为进一步研究团头鲂两种热休克蛋白 70 的抗病抗逆机理以及相关疫苗的制备奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌株 原核表达载体 pET-22b(+), 大肠杆菌 BL21(DE3)购自 Novagen 公司。大肠杆菌 DH5 α 、pMD18/Ma-HSC70 和 pMD18/Ma-HSP70 由本

* 农业部行业专项, 200803013 号; 现代农业产业技术体系建设专项, nycytx-49-18 号。明建华, 博士, E-mail: mingjianhua686@yahoo.com.cn

通讯作者: 徐 跑, 研究员, E-mail: xup@ffrc.cn; 谢 骏, 研究员, E-mail: xiej@ffrc.cn

收稿日期: 2011-03-01, 收修改稿日期: 2011-08-09

实验室保存。

1.1.2 主要试剂 LA *Taq* DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Nde* 和 *Xho*, T4 DNA Ligase, IPTG, DNA 凝胶回收和质粒纯化试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 菌体蛋白抽提试剂盒 BugBuster Master Mix 和蛋白质纯化柱 Ni-NTA His Bind Resin 购自 Novagen 公司; DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱购自美国 GE 公司; 抗人的兔源 HSP70 多克隆抗体购自 Stressgen 公司; 羊抗兔 IgG-HRP 酶标二抗购自晶美生物公司; ECL 试剂购自 Pierce 公司; 蛋白分子量标准、考马斯亮蓝 R250 和 SDS-PAGE 试剂等购自上海生物工程公司。

1.2 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 基因编码区的 PCR 扩增

根据作者克隆到的 Ma-HSC70、Ma-HSP70 cDNA 全序列 (GenBank accession nos. Ma-HSC70: EU623471; Ma-HSP70: EU884290), 分别设计两对引物用于扩增两基因完整的编码区部分(不包括终止密码子 TAA), 并在引物的 5'和 3'端序列分别引入两基因内部没有的新的酶切位点 *Nde* 和 *Xho*, 以便于基因的酶切和定向克隆。

引物序列如下:

Ma-HSC70 的上游引物 P1 为 5'-TA^{CAATATG}TCC-AAGGGACCAGCTGTTGGT-3', 下游引物 P2 为 5'-CC-GCTCGAGGTCGACCTCCTCGATGGTT-3'; Ma-HSP70 的上游引物 P3: 5'-TTC^{CAATATG}TCATCAGCAAAAG-GAGTC-3', 下游引物 P4: 5'-CCGCTCGAGATCCAC C-TCTTCAATAGTT-3'。方框代表 *Nde* 的酶切位点, 下划线处代表 *Xho* 的酶切位点。

分别以质粒 pMD18/Ma-HSC70 和 pMD18/Ma-HSP70 为模板, 利用 LA *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应条件均为 94 3min, 然后 30 个循环 (94 30s, 58 30s, 72 1.5min), 最后 72 继续延伸 10min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 然后采用 PCR 纯化试剂盒回收两目的基因。

1.3 重组质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的构建及鉴定

将以上获得的两目的基因和表达载体 pET-22b(+) 分别用 *Nde*、*Xho* 双酶切, 经纯化回收的目的片段与载体分别在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 放置 16h, 连接产物取 10μl 转化感受态 *E. coli* DH5α, 涂布于含氨苄青霉素 100μg/ml 的 LB 平板上, 37 培养过夜, 次日挑选单菌落接种于 LB 液体培养基(含 100μg/ml 氨苄青霉素), 37 振荡培养 12—16h, 用质粒纯化试剂盒抽提质粒, 通过 *Nde* 和 *Xho* 双酶切

以及 PCR 鉴定, 筛选含插入片段的阳性克隆, 送上海英骏生物公司测序。

1.4 重组质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的原核表达及鉴定

将测序鉴定后的重组质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 转入 *E. coli* BL21(DE3), 分别挑单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37℃ 培养过夜, 次日以 1 50 (体积比)转接至新鲜 LB 液体培养基(含 100μg/ml 氨苄青霉素, 0.6%葡萄糖), 37℃, 200r/min 培养菌液至 OD_{600} 为 0.5—0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 37℃ 诱导表达 5h, 各取 3 管菌液, 每管 1ml, 10000r/min 离心 2min(4℃), 倒去培养液, 加 100μl 1×SDS 上样缓冲液重悬, 100℃ 煮沸 5min, 冷却至室温后 12000r/min 离心 10min, 取上清等量上样, 进行 8% SDS-PAGE 分析。以含空质粒 pET-22b(+)的菌株作为阴性对照。

聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用半干电转仪(Bio-rad)将蛋白转移到硝酸纤维素膜(PVDF)上, 5%脱脂奶粉室温封闭 1h, 转至兔抗人 HSP70 一抗(1 1000 稀释)中 4℃ 孵育过夜, 用 TBST 室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 10min, 加入羊抗兔 IgG-HRP 酶标二抗(1 2000 稀释), 室温下孵育 1h, 充分洗涤后用化学发光法显色, 压片显影定影。

1.5 温度和时间对 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白诱导表达形式的影响

设置 3 个温度组, 当含有 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的大肠杆菌 BL21 于 37℃ 振荡培养至菌液 OD_{600} 为 0.5—0.7 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 1mmol/L, 分别在 37℃、30℃ 和 25℃ 下依次诱导 1、3、5、7、9h。在各时间点收集不同条件诱导的菌液各 3 管, 每管 1ml, 4℃ 10000r/min 离心 2min 收集菌体, -20℃ 保存, 直至所有样品收集完全。以未经 IPTG 诱导的带有 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 重组质粒菌株分别作为阴性对照。

向以上每管菌体中加入 100μl BugBuster 蛋白抽提液, 用枪头吸打重悬, 室温下在摇板上孵育 20min, 然后 4℃ 12000r/min 离心 20min, 吸取上清为可溶性部分; 沉淀重悬于 100μl 磷酸缓冲液(pH 7.4), 为不可溶的包涵体部分。上清和沉淀各加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液, 煮沸变性后等量上样, 进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝 R250 染色和脱色操作。用 Bandscan 5.0 软件对目的蛋白的表达含量进行分析。

1.6 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白的优化表达、纯化及鉴定

取含有 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的大肠杆菌 BL21 过夜培养液, 以 1:100 (体积比)接入新鲜 LB 液体培养基(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素, 0.6%葡萄糖), 30 $^{\circ}$ C, 200r/min, 进行大量培养。当菌液 OD_{600} 为 0.5—0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 带有 pET-22b(+)/Ma-HSC70、pET-22b(+)/Ma-HSP70 的大肠杆菌分别在 30 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 下诱导表达 7h 后离心收菌。按每克细胞糊(湿重)加入 5ml Bug-Buster 蛋白抽提试剂, 用枪头吸打混匀, 室温下在摇板上孵育 20min, 然后 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 20min, 将上清转移到 Novagen Ni-NTA His Bind Resins 蛋白纯化柱, 使用亲和层析方法分别纯化两种目的融合蛋白(C 端带 6 $\times$ His tag)。将纯化的蛋白洗脱液再过 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱, NaCl 梯度洗脱, 收集峰值蛋白液。纯化蛋白液用 SDS-PAGE 检测分析, 并通过 Western-blotting 进行鉴定, 方法同 1.4。

2 结果

2.1 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 基因编码区的 PCR 扩增

以团头鲂质粒 pMD18/Ma-HSC70 为模板, 用引物 P1、P2 扩增 Ma-HSC70 的编码区, 得到约 2000bp 的条带, 与目的片段的 1961bp 大小一致; 以质粒 pMD18/Ma-HSP70 为模板, 用 P3、P4 扩增 Ma-HSP70 的编码区, 得到约 2000bp 的条带, 也与目的片段的 1944bp 大小吻合(图 1A)。

2.2 重组质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的构建及鉴定

抽提转化菌株的质粒, 分别用 *Nde* 与 *Xho* 双酶切, 均得到 2 条条带, 大小均约为 5.4kb 和 2.0kb, 其中较大片段与载体 pET-22b(+)的大小一致, 而较小片段与插入目的基因的大小也吻合; 以各自的质粒为模板, 分别用引物 P1、P2 和 P3、P4 进行 PCR 检测, 均扩增得到约 2.0kb 的条带, 也与预期的结果相符(图 1B)。重组质粒的测序结果与 GenBank 上团头鲂 HSC70 和 HSP70 基因序列一致, 表明成功构建了团头鲂两种热休克蛋白 70 的原核表达质粒, 即 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70。

2.3 重组质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的原核表达及鉴定

SDS-PAGE 结果显示, 在 37 $^{\circ}$ C 经 IPTG 诱导表达 5h, 含重组质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/

Ma-HSP70 的大肠杆菌 BL21 在相对分子量约 72kDa 处各有一条明显的蛋白条带, 而含空质粒 pET-22b(+)的菌无此变化(图 2A)。Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 的相对分子量分别为 71.24kDa 和 70.52kDa, pET-22b(+)载体表达的 *Xho* 酶切位点氨基酸和 6 个组氨酸标签(C 端)的相对分子量为 1.08kDa, 表明诱导表达的融合蛋白与预期的相对分子量大小一致。

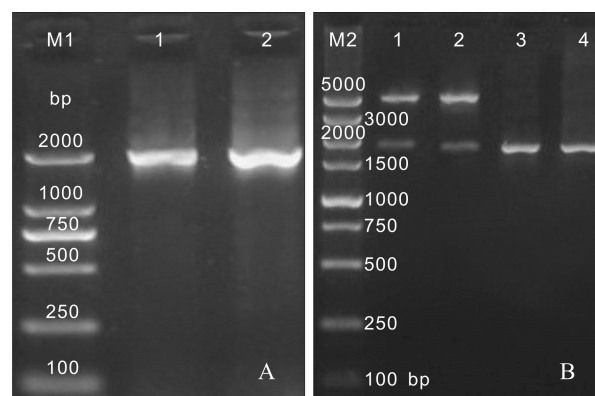


图 1 团头鲂 HSC70 和 HSP70 基因编码区的 PCR 扩增(A)以及重组质粒的双酶切和 PCR 鉴定(B)

Fig.1 PCR amplification of HSC70 and HSP70 ORFs (A), and Identification of recombinant plasmids by double-digestion of restriction endonucleases and PCR (B) in *M. amblycephala* A: M1: DL2000 DNA 分子量标准; 1: Ma-HSC70 基因编码区片段; 2: Ma-HSP70 基因编码区片段。B: M2: DL5000 DNA 分子量标准; 1: pET-22b(+)/Ma-HSC70 经 *Nde* 和 *Xho* 双酶切产物; 2: pET-22b(+)/Ma-HSP70 经 *Nde* 和 *Xho* 双酶切产物; 3: pET-22b(+)/Ma-HSC70 经 PCR 鉴定产物; 4: pET-22b(+)/Ma-HSP70 经 PCR 鉴定产物

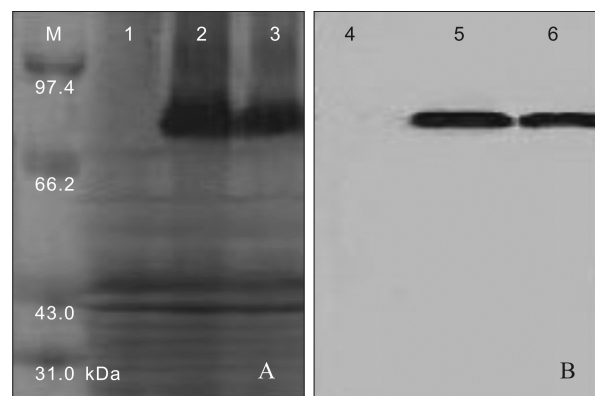


图 2 重组质粒原核表达产物的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western-blotting 鉴定(B)

Fig.2 SDS-PAGE analysis (A) and Western-blotting identification (B) of prokaryotic expression products of recombinant plasmids

M: 蛋白质分子量标准; 1—3: 分别为含 pET-22b(+), pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的大肠杆菌 BL21 在 37 $^{\circ}$ C 诱导 5h; 4—6: 为 1—3 对应的 Western-blotting

为进一步对上述融合蛋白进行验证, 以免抗人的多抗为一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔为二抗, 进行 Western-blotting 分析, 在相对分子量约 72kDa 处也各有单一的条带, 而含空质粒的对照无此条带 (图 2B), 表明这两种重组质粒的表达产物为团头鲂热休克蛋白 70 的融合蛋白。

2.4 温度和时间对 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白表达形式的影响

样品菌体经裂解后分离上清与沉淀, 通过 SDS-PAGE 和软件 BandsScan 5.0 分析 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白的表达形式, 从而摸索两种融合蛋白的最佳表达条件。

对于 Ma-HSC70 融合蛋白, 在 37℃ 下的表达量很高, 但主要以包涵体形式存在, 约占目的蛋白表达量的 90%, 只有少量的可溶性表达, 诱导 3h 时表达量达到最高, 后无明显变化 (图 3 上); 在 30℃ 下融合蛋白以包涵体形式的表达量明显下降, 可溶性蛋白的表达量升高, 5h 时达到最高, 此时两种表达形式的蛋白约各占 50% (图 3 中); 在 25℃ 下融合蛋白主要以可溶性形式表达, 7h 的表达量达到最高, 约占目的蛋白表达量的 80% (图 3 下)。作为对照的空质粒组和未诱导组没有检测到 Ma-HSC70 融合蛋白的表达。

对于 Ma-HSP70 融合蛋白, 在 37℃ 下既有可溶性表达, 也有包涵体形式的表达, 二者的表达量均较高, 上清中的融合蛋白在诱导 3h 时表达量达到最高, 约占目的蛋白表达量的 50% 以上 (图 4 上); 在 30℃ 下融合蛋白以包涵体形式的表达量有所下降, 可溶性蛋白的表达量升高, 7h 时达到最高, 约占目的蛋白表达量的 60% (图 4 中); 在 25℃ 下融合蛋白主要以可溶性形式表达, 9h 的表达量达到最高, 约占目的蛋白表达量的 70% (图 4 下)。作为对照的空质粒组和未诱导组没有检测到 Ma-HSP70 融合蛋白的表达。

由此可见, 低温有利于融合蛋白的可溶性表达, 降低表达蛋白包涵体的形成, 但在低温下, 融合蛋白的表达速度慢, 需要较长的诱导表达时间, 且在后期也会形成一定程度的包涵体。综合以上因素, 选择融合蛋白 Ma-HSC70 在 25℃ 和 Ma-HSP70 在 30℃ 下分别诱导 7h 作为可溶性表达的最佳条件。

2.5 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白的优化表达、纯化及鉴定

取优化表达的大肠杆菌 BL21, 经裂解后分离上清, 利用 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白上的 6 ×

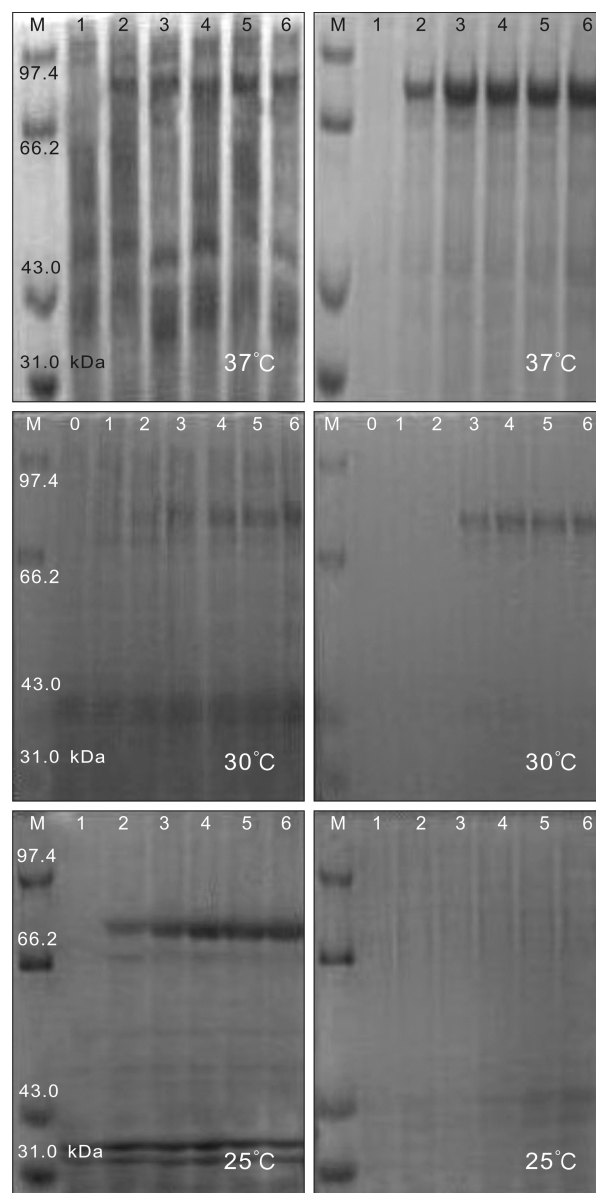


图 3 团头鲂 HSC70 融合蛋白在不同温度和时间下诱导表达形式的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of soluble and insoluble Ma-HSC70 fusion protein expressed at different temperatures and times. Left column: supernatant part; Right column: pellet part; M: protein molecular weight standard; 0: empty vector pET-22b(+) of *E. coli* BL21 induced for 5h at 30°C; 1: pET-22b(+)/Ma-HSC70 of *E. coli* BL21 induced for 9h at 37°C, 30°C, 25°C; 2—6: pET-22b(+)/Ma-HSC70 of *E. coli* BL21 induced for 1, 3, 5, 7, 9h at 37°C, 30°C, 25°C respectively.

His 标签 (C 端), 用 Ni-NTA His Bind Resins 进行亲和纯化, 然后再经 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱层析, 分别得到纯化的 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白。

将上述两种未经纯化和纯化后的产物进行 SDS-PAGE 检测分析, 发现在相对分子量约 72kDa 处

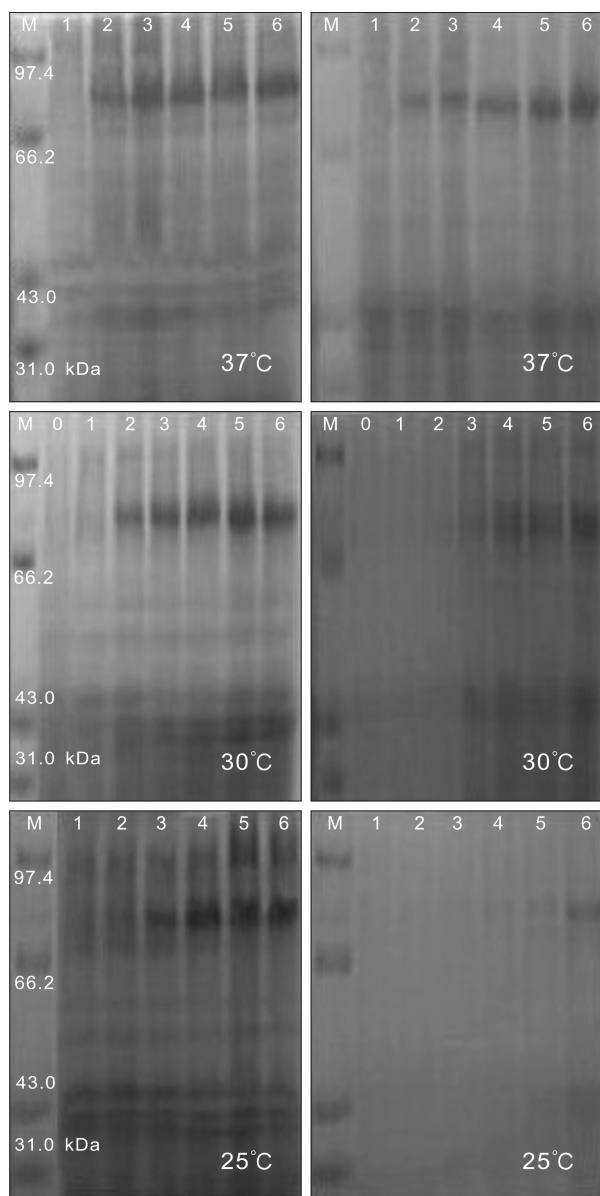


图4 团头鲂 HSP70 融合蛋白在不同温度和时间下诱导表达形式的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of soluble and insoluble Ma-HSP70 fusion protein expressed at different temperatures and times
左列: 上清液部分; 右列: 沉淀部分; M: 蛋白质分子量标准; 0: 含空质粒 pET-22b(+)的大肠杆菌 BL21 在 30°C 诱导 7h; 1: 含 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的大肠杆菌 BL21 分别在 37°C、30°C、25°C 下 9h, 未诱导; 2—6: 分别为含 pET-22b(+)/Ma-HSP70 的大肠杆菌 BL21 在 37°C、30°C、25°C 下依次诱导 1、3、5、7、9h

各有一条明显的蛋白条带(图 5A); 对应的 Western-blotting 鉴定表明在相对分子量约 72kDa 处也各有单一的抗体结合带, 而且纯化后的条带颜色较深(图 5B), 说明表达产物均为团头鲂热休克蛋白 70 的融合蛋白。纯化后的 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白经凝胶薄层扫描分析, 蛋白纯度分别达到 96.3%和 95.8%。

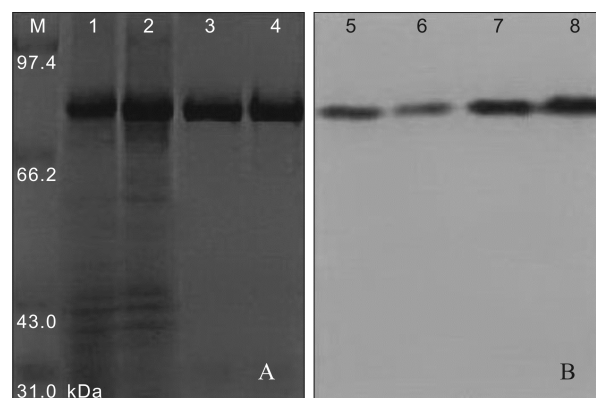


图5 两种融合蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western-blotting 鉴定(B)

Fig.5 SDS-PAGE analysis (A) and Western-blotting identification (B) of two purified fusion proteins

M: 蛋白质分子量标准; 1: Ma-HSC70 融合蛋白纯化前的上清; 2: Ma-HSP70 融合蛋白纯化前的上清; 3: Ma-HSC70 融合蛋白纯化后的上清; 4: Ma-HSP70 融合蛋白纯化后的上清。5—8: 为 1—4 对应的 Western-blotting

3 讨论

HSP70 家族具有一个普通结构, 即一个高度保守的 N 端 ATPase 功能域(ATPase domain)和 C 端多肽结合功能域(Polypeptide-binding domain)(Kiang *et al*, 1998; Hartl *et al*, 2002)。ATPase 功能域主要由 2 个大的球形亚功能域(Globular subdomain)所组成, 其间被一个深的中央裂缝所分开, 并通过 2 个交叉的螺旋相连接; C 端多肽结合功能域由一个紧密的 β -三明治(β -sandwich)结构和 5 个松弛的 α -螺旋(α -helix)结构组成(Zhu *et al*, 1996)。C 端多肽结合功能域倾向与蛋白的疏水区相结合, 而这些结构区在天然蛋白中被折叠隐藏于内部而无法接近, 也就是说 HSP70s 倾向于与尚未折叠或因有害因素破坏了折叠结构的肽链结合, 并依靠其 N 端的 ATP 酶活性, 利用 ATP 促成这些肽链的正确折叠、移位、修复或降解(苏洁等, 2006)。

HSP70s 还可作为多肽免疫载体及佐剂参与抗原交叉递呈作用, 刺激机体对与之融合/结合的蛋白质产生强烈、持久的免疫应答(Wu *et al*, 2005)。有许多研究已经证明其与肿瘤抗原肽结合后具有抗肿瘤功能(Tamura *et al*, 1997; Ito *et al*, 2005)。此外, 采用 HSP70s 与抗原肽在体外交联, 同样也可以诱导抗原特异性的细胞免疫(Castelli *et al*, 2001), 这就为采用 HSP70s 介导的免疫治疗提供了一条新的途径, 即采用基因工程技术体外表达纯化 HSP70s, 然后与已知的抗原交联, 用以诱导抗原特异性的免疫应答。目前,

在水产动物中还未见相关的研究报道。

本实验选用了具有 T7 *lac* 启动子的原核高效表达载体 pET-22b(+), 并选用低蛋白酶活性的表达菌株 BL21(DE3), 由于 T7 RNA 聚合酶的调控方式仍有痕量的本底表达, 故在培养基中外加了 0.6% 的葡萄糖, 用于控制基因的基础表达水平。本实验中, 未经 IPTG 诱导组均未发现两种融合蛋白有明显的本底表达。根据 Novagen pET 系统手册, 带有 T7 *lac* 启动子的载体需要终浓度为 1mmol/L IPTG 才能完全诱导, 但作者以终浓度分别为 0.5、1.0、1.5mmol/L IPTG 进行诱导表达, 未发现目的融合蛋白的表达量有明显的变化。

本实验中, 作者将组成型 Ma-HSC70 和诱导型 Ma-HSP70 基因的编码区(不包括终止密码子)分别克隆到载体 pET-22b(+)中, 成功构建了 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70 两种原核表达质粒, 在大肠杆菌 BL21 中经 IPTG 诱导后均高效表达相对分子量约为 72kDa 的融合蛋白, 与预期目的蛋白的大小一致, 经 Western-blotting 验证为相应的 Ma-HSC70 和 Ma-HSP70 融合蛋白。在研究温度和时间对两种融合蛋白表达形式的影响中, 发现在 37℃ 下诱导 3h 时两种融合蛋白的表达量均达到最高, 约占全菌总蛋白量的 55% 以上, 但 Ma-HSC70 融合蛋白主要以包涵体形式存在, 约占目的蛋白表达量的 90% 以上, 而 Ma-HSP70 融合蛋白约 50% 以上存在于上清中。这种表达形式的差异可能与两种蛋白的功能(Baler *et al*, 1993; Feder *et al*, 1999)及其基因的结构有关(Ming *et al*, 2010), Ma-HSC70 基因在编码区含有 7 个内含子, 而 Ma-HSP70 基因在编码区不含内含子。随着诱导温度的降低, 两种融合蛋白的表达速度也有所下降, 但可溶性目的蛋白的比例升高。在 25℃ 下, 两种融合蛋白主要以可溶性形式存在于上清中, 其中 Ma-HSC70 在诱导 7h 的表达量最高, 约占其目的蛋白表达量的 80%, 而 Ma-HSP70 在诱导 9h 的表达量最高, 约占其目的蛋白表达量的 70%。由此可见, 低温有利于融合蛋白的可溶性表达, 降低表达蛋白包涵体的形成, 但在低温下需要较长的诱导表达时间, 且在后期也会形成一定程度的包涵体。综合各种因素, 本实验选择融合蛋白 Ma-HSC70 在 25℃ 和 Ma-HSP70 在 30℃ 下分别诱导 7h 作为可溶性表达的最佳条件。

本实验中, 作者选用 Novagen 专利的 BugBuster 蛋白抽提试剂(含溶菌酶和核酸酶)用于温和破坏大肠杆菌细胞壁以释放活性蛋白, 避免了使用超声波或

弗式压榨等激烈机械法引起蛋白质的变性, 便于制备表达蛋白用于下游的纯化等应用。载体 pET-22b(+)在插入片段的下游带有 6× His 标签, 便于外源蛋白的纯化, 其没有免疫原性, 作为融合蛋白很小的部分, 也基本不影响重组蛋白的结构和功能(史洪博等, 2006; 刘臻等, 2010)。本实验中, 两种经镍柱纯化的融合蛋白的纯度均达到 90% 以上, 再经 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱层析后的纯度可达到 95% 以上。这两种纯化于可溶性上清的融合蛋白, 最大限度地保持了蛋白质的天然构象。

总之, 本研究成功地构建了团头鲂两种原核表达质粒 pET-22b(+)/Ma-HSC70 和 pET-22b(+)/Ma-HSP70, 通过优化表达条件, 对表达产物进行了纯化和鉴定, 最后得到了纯度均在 95% 以上的两种热休克蛋白 70 的融合蛋白。该两种纯化的融合蛋白可分别用于制备鱼类 HSC70 和 HSP70 的单克隆抗体, 并用于 HSP70s 相关表达的检测。此外, 通过对鱼活体注射 HSC70 和 HSP70, 可进一步研究两种蛋白在鱼类应激状态下的保护作用。

参 考 文 献

- 史洪博, 段秀梅, 李树蕾等, 2006. 结核分支杆菌 HSP70 原核表达载体的构建和表达及蛋白纯化. 吉林大学学报(医学版), 32(6): 989—992, 999
- 刘 臻, 罗小华, 鲁双庆等, 2010. 鳊(*Siniperca chuatsi*)生长激素基因克隆和原核表达. 海洋与湖沼, 41(3): 365—370
- 苏 洁, 蔡 宏, 朱玉贤, 2006. 结核分枝杆菌热休克蛋白 Hsp70 在原核表达载体中的克隆表达与鉴定. 中国人兽共患病学报, 22(8): 712—715
- 谢数涛, 吴 任, 许忠能等, 2005. 亚致死温度热休克对凡纳滨对虾的保护作用. 中山大学学报(自然科学版), 44(6): 87—89
- Baler R, Dahl G, Voellmy R, 1993. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol*, 13(4): 2486—2496
- Basu N, Todgham A E, Ackerman P A *et al*, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2): 173—183
- Castelli C, Ciupitu A M, Rini F *et al*, 2001. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antineoplastic T cells. *Cancer Res*, 61(1): 222—227
- DuBeau S F, Pan F, Tremblay G C *et al*, 1998. Thermal shock of salmon *in vivo* induces the heat shock protein hsp70 and confers protection against osmotic shock. *Aquaculture*, 168(1—4): 311—323
- Feder M E, Hofmann G E, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 61(1): 243—282

- Hartl F U, Hayer-Hartl M, 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561): 1852—1858
- Ito A, Fujioka M, Tanaka K *et al*, 2005. Screening of cytokines to enhance vaccine effects of heat shock protein 70-rich tumor cell lysate. *J Biosci Bioeng*, 100(1): 36—42
- Johnston R N, Kucey B L, 1988. Competitive inhibition of hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science*, 242(4885): 1551—1554
- Kiang J G, Tsokos G C, 1998. Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther*, 80(2): 183—201
- Ming J H, Xie J, Xu P *et al*, 2010. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish Shellfish Immunol*, 28(3): 407—418
- Sørensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett*, 6(11): 1025—1037
- Tamura Y, Peng P, Liu K *et al*, 1997. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 278(5335): 117—120
- Tedengren M, Olsson B, Reimer O *et al*, 2000. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquatic Toxicol*, 48(1): 1—12
- Wu Y, Wan T, Zhou X *et al*, 2005. Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8⁺ CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Res*, 65(11): 4947—4954
- Zhu X T, Zhao X, Burkholder W F *et al*, 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272(5268): 1606—1614

PROKARYOTIC EXPRESSION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF TWO HSP70s IN WUCHANG BREAM *MEGALOBRAMA AMBLYCEPHALA*

MING Jian-Hua^{1, 2, 3}, XIE Jun², XU Pao², GE Xian-Ping²,
LIU Wen-Bin³, YE Jin-Yun¹

(1. College of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou, 313000; 2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081; 3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, 214081)

Abstract In this research, The fragments of Constitutive HSC70 and inducible HSP70 ORFs of Wuchang bream *Megalobrama amblycephala* were amplified by PCR, and then cloned into prokaryotic expression vector pET-22b(+). The two recombinant plasmids, confirmed by double-endonuclease digestion and DNA sequencing, were transformed into competent *E. coli* BL21 (DE3). The two recombinant strains were induced by 1mmol/L IPTG at different temperatures and times, establishing optimal conditions for inducible expression. The expression products were purified by Ni-NTA His Bind Resins affinity chromatography and DEAE-Sepharose FF anion-exchange chromatography, and detected by SDS-PAGE and Western-blotting. The results show that two recombinant expression plasmids of pET-22b(+)/Ma-HSC70 and pET-22b(+)/Ma-HSP70, each expressing a 72kDa protein that could be recognized by rabbit source anti-HSP70 polyclonal antibody, were successfully constructed, and the purity of two purified fusion proteins was more than 95%. A higher temperature (37℃) was conducive to the rapid expression of fusion protein, which was easy to form inclusion body; a lower temperature (25℃) was in favor of the soluble expression of fusion protein, but also reduced the expression rate of fusion protein. All things considered, the optimal conditions for expressions of two fusion proteins of Ma-HSC70 and Ma-HSP70 are induced for 7h. at 25℃ and 30℃, respectively. In this study, two higher purified fusion protein of Ma-HSC70 and Ma-HSP70 have been obtained by prokaryotic expression of two HSP70s of Wuchang bream, thus laying foundation for further research on molecular structure and function of two proteins and associated antibodies.

Key words Wuchang bream *Megalobrama amblycephala*, Heat shock protein 70, Prokaryotic expression, Fusion protein, Purification, Identification