

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)蛋白质二硫键异构酶 SmPDIA3 的表达分析和功能验证*

唐启政^{1, 2, 3} 孙志宾^{1, 3} 王新安^{1, 3} 马爱军^{1, 3} 杨双双^{1, 3} 黄智慧^{1, 3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究利用 SMART-RACE 技术克隆了大菱鲂 SmPDIA3 基因。SmPDIA3 基因 cDNA 序列全长 2083bp, 包括 1479bp 的开放阅读框, 编码 492 个氨基酸, GenBank 登录号: MG765516。组织表达分析发现: SmPDIA3 基因在肠、鳃、肝脏等组织中均有表达, 其中在肝脏中表达量最高, 脑中最低。进一步研究了温度胁迫后 SmPDIA3 基因在肠和肝脏组织中的表达变化规律, 发现随着胁迫温度的升高, SmPDIA3 基因的相对表达量总体上升, 并在 28°C 时达到最大。利用原核表达技术, 构建了 pET-28a-PDIA3 原核表达载体, IPTG 诱导后融合蛋白主要在上清中表达。将上清中的蛋白分离纯化后, 利用 Western blot 技术验证了目的蛋白的准确性。将纯化后的目的蛋白浓缩后, 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得蛋白浓度为 243.18μg/mL。最后设计变性溶菌酶的复性实验, 验证了 SmPDIA3 蛋白具有分子伴侣功能, 能够辅助变性蛋白的正确折叠。

关键词 大菱鲂; RACE; SmPDIA3; 原核表达; 分子伴侣

中图分类号 Q955; Q789; S965 doi: 10.11693/hyhz20181000247

蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)是一类能够催化蛋白质折叠的酶, 是生物体蛋白质合成过程所必须的(Freedman *et al*, 1994)。蛋白质二硫键异构酶 A3 (protein disulfide isomerase A3, PDIA3), 是蛋白质二硫键异构酶(PDI)家族的一员, 具有催化内质网中蛋白质二硫键形成、氧化还原及异构化的作用(胡玥等, 2015)。PDIA3 的二硫键氧化异构活性与其自身所具有的硫氧还原蛋白结构域有关, PDIA3 包括 4 个这样的硫氧还原蛋白区域: 两个具有硫氧还原蛋白的活性位点 WCGHCK (命名为 a-型区域), 另两个区域缺少活性位点(命名为 b-型区域)(吕利霞等, 2010)。

PDIA3 主要分布于细胞内质网腔, 但其在细胞

表面、细胞核和线粒体等不同部位也广泛存在(Turano *et al*, 2002), 各自发挥不同的作用。例如, PDIA3 在精子头部的表面表达, 似乎有助于精卵细胞融合(Ellerman *et al*, 2006); 在血小板表面调控血小板生理功能、血栓形成和生理性止血(王璐, 2012); 参与人类肝癌细胞的 STAT3 信号转导通路(Guo *et al*, 2002); 在 FFA 诱导的肝细胞脂肪变性和细胞凋亡中起关键作用(Zhang *et al*, 2015); 在用甲基苯丙胺处理原代纹状体神经元后显著上调, 揭示其神经保护作用(Pendyala *et al*, 2012); 核 ERp57 在体内与黑色素瘤细胞中的 DNA 片段相互作用, 并可能参与其靶基因的转录调控(Aureli *et al*, 2013)。

PDIA3 蛋白有如此重要的功能, 而迄今未见大

* 现代农业产业技术体系专项, CARS-47-G01 号; 青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才”培养计划项目, 2017ASTCP-OS04 号; 国家自然科学基金项目, 41706168 号; 山东省重点研发计划, 2016GSF115019 号; 山东省良种工程, 2016LZGC031 号。唐启政, 硕士研究生, E-mail: tqz18253563006@163.com

通信作者: 王新安, 副研究员, E-mail: wangxa@ysfri.ac.cn; 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-10-22, 收修改稿日期: 2018-12-06

菱鲃 PDIA3 的研究报道。大菱鲃 (*Scophthalmus maximus*) 是原产于欧洲的冷温性鱼类, 目前是我国北方沿海重要的海水养殖鱼类, 水体温度是其养殖过程中最重要的环境因子之一, 高温严重影响大菱鲃摄食、生长和体内的各种蛋白酶活性等(高淳仁等, 2006; 李勇等, 2011)。针对养殖生产中的一些不利因素, 科研工作者们已经开始了一些基于 SNP 标记、微卫星标记等标记辅助的分子育种研究, 来提高大菱鲃的种质以应对这些生产实际问题(王婷等, 2014; 郭建丽等, 2015)。本文拟克隆大菱鲃 SmPDIA3 基因 cDNA 全长, 分析该基因在健康鱼体各组织的表达情况及其在高温胁迫后的表达模式, 并进行了该基因的体外原核重组表达及功能分析, 为了解大菱鲃高温胁迫应答机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

实验所需大菱鲃饲养于烟台开发区天源水产有限公司, 所选取大菱鲃健康有活力, 平均体重为 (250 ± 12.2) g, 均为人工繁育的健康幼鱼。试验前将大菱鲃幼鱼在实验水池内暂养一周, 确保其能够正常摄食, 暂养期间控制水温为 $14 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。暂养与实验期间每天下午 5 点投喂一次饵料, 保证供氧充足, 每天换 1 次水。

1.2 主要试剂

动物组织总 RNA 提取试剂盒(RNAPrep pure Tissue Kit)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANgel Midi Purification Kit)均购自天根生化科技(北京)有限公司; 原核表达载体 pET28a (+)、限制性内切酶 BamH I 和 Hind III、LA-taq 酶和 RACE 试剂盒(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit)购自宝日医生物技术(北京)有限公司; pEASY-T1 载体以及 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞、*E. coli* transettea(DE3)大肠杆菌感受态细胞、亲和层析树脂填料、反转录试剂盒(TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)和实时荧光定量试剂盒(TransStart Top Green qPCR SuperMix)购自北京全式金生物技术有限公司; E.Z.N.A.Plasmid Mini kit I 小量质粒提取试剂盒购自 OMEGA 生物工程有限公司; 透析袋 MD25 (8000—14000D)、聚乙二醇 PEG 20000、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAB 法显色试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司; 溶菌酶(LZM)测试盒购自南京建成生物工程研究所; 一抗

(Anti-6×His rabbit polyclonal antibody)、二抗(HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG)及 PCR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 温度胁迫实验 随机挑取暂养 7d 的大菱鲃分为 4 组: 对照组(14°C)、实验组 1(20°C)、实验组 2(25°C)、实验组 3(28°C)。升温方法参考 Ndong 等(2007), 稍作改动: 从正常水温 $14 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 按每 6h 增加 1°C 的速度升至 20°C 作为实验组 1, 然后按每 12h 增加 1°C 的速度升至 25°C 为实验组 2, 接着按每 24h 增加 1°C 的速度升高至水温 28°C 为实验组 3。对照组和实验组各设 3 个平行组, 每组投放 15 尾大菱鲃幼鱼。采用静水法充气培养, 恒温加热棒自动控温, 保证 4 个温度组同步进行。实验鱼在实验温度下 6h 后, 每个平行组随机取 3 尾鱼, 置于解剖盘内, 取肝、皮、鳃等组织于液氮中保存, 用于 RNA 的提取。

1.3.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 各组织总 RNA 提取参照总 RNA 提取试剂盒说明书提取, 提取完成后通过核酸定量仪检测所提取的 RNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性, 检测完成后, 将其放置于超低温冰箱中保存。另取肝脏总 RNA, 按照 RACE 试剂盒说明书分别合成用于 3' 和 5' 末端 PCR 扩增的 RACE 模板, -20°C 保存。

1.3.3 引物设计与中心片段序列克隆 根据本实验室高温转录组测序所得的 PDIA3 基因原始序列, 利用 Primer Premier5.0 软件在保守区域设计引物 PDIA3-F 与 PDIA3-R(表 1), 扩增大菱鲃 PDIA3 基因的中心片段序列。PCR 反应条件如下: 94°C 5min; 94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 30s, 35 个循环; 72°C 5min, 4°C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将单一的目的条带切胶, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 取 $1\mu\text{L}$ 回收产物与 $4\mu\text{L}$ pEASY-T1 载体在 25°C 下连接 10min, 然后转化 $50\mu\text{L}$ 刚解冻的 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞, 加入 $250\mu\text{L}$ LB 液体培养基 37°C 、200r/min 震荡培养 1h, 取 $200\mu\text{L}$ 菌液涂布 LB 固体平板(Amp^+), 37°C 过夜培养进行蓝白斑筛选。第二天挑取白色单菌落接入 1mL LB 液体培养基中震荡培养 6h, 利用菌液 PCR 验证挑取的菌样, 电泳检测后将条带大小合适的菌液样品送至生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.3.4 3' RACE 和 5' RACE 扩增 根据获得的中心片段序列设计 PDIA3 全长 cDNA 的 3' 和 5' RACE 特异性引物(表 1)。以 1.3.2 中 cDNA 为模板, 分别与

引物 UPM(long)配对进行 3'与 5' RACE 第 1 轮 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.0μL, dNTP Mixture (10mmol/L) 3.2μL, PDIA3-F1/PDIA3-R1 (10μmol/L) 0.8μL, UPM (long) 0.8μL, LA Taq 酶 0.4μL, cDNA 0.4μL, 加 ddH₂O 补至 20μL。反应条件为: 预变性 94°C, 5min; 变性 94°C, 30s; 72°C, 3min; 循环 5 次。变性延伸 94°C, 30s; 退火 70°C, 30s; 延伸

72°C, 3min; 循环 5 次。变性延伸 94°C, 30s; 退火 68°C, 30s; 延伸 72°C, 3min; 循环 25 次。4°C 保存。将第 1 轮 PCR 产物稀释 10 倍用作第 2 轮 PCR 的模板, UPM(short) 替代 UPM(long), PDIA3-F2/PDIA3-R2 (10μmol/L)替代 PDIA3-F1/PDIA3-R1 (10μmol/L), 其余组分均不变, 反应条件与第一轮相同, 余下步骤同 1.3.3。

表 1 实验中所用的引物序列
Tab.1 Sequences of primers used in experiment

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
PDIA3-F	AGTGGCTACCCAACCT	中心片段
PDIA3-R	TCACCTCAGACCACCCT	
PDIA3-F1	GCTATCTCAAATCCGAGCCAT	3' RACE-PCR
PDIA3-F2	TTGCCAAGATGGACGCCACAGC	
PDIA3-R1	TCTTCGCCACCTTCATCACC	5' RACE-PCR
PDIA3-R2	AACCCAACAACACTTGCGTC	
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	通用引物
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
PDIA3-RTF	GGAACATTCACCAGCATCAAGATCAAG	RT-PCR
PDIA3-RTR	GTCAACGTCATAATAAGCCACCAACAG	
β-actin F	GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA	原核表达
β-actin R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT	
ORF(F)	GGTGTGCGATGTTGAGAC	原核表达
ORF(R)	TGGCTCAGAGCATTCCG	
MP(F)	AATGGGTCGCGGATCCAGTGATGTGCTGGAGTACACGG	
MP(R)	GTGCGGCCGCAAGCTTTTATAGCTCAATCCTCTTTTTC	

1.3.5 SmPDIA3 基因的序列分析 利用 ORF Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>)预测其开放阅读框, 利用 EditSeq 软件预测其氨基酸序列, 利用 ExPASy 软件 (http://web.expasy.org/compute_pi/)预测其分子量和等电点, 利用在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽, 利用在线软件 SOPMA (<https://prabi.ibcp.fr/htm/site/web/home>)预测二级结构, 利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测三级结构, 利用 DNAMAN 软件进行序列同源性比对, 从 GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中下载其他物种的 PDIA3 基因蛋白质序列, 利用 MAGE 6.0 软件构建该基因的 NJ 系统进化树。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 选出上述提取的大菱鲂的肠、鳃、肝脏、皮肤、脾、脑、肾脏和心脏总 RNA(每个组织选取 3 个个体)。使用反转录试剂盒合成 cDNA, 放置于-20°C 保存。根据 PDIA3 基因 ORF

设计引物 PDIA3-RTF 和 PDIA3-RTR(表 1), 以 β-actin 为内参基因, 利用 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪分析大菱鲂 PDIA3 基因表达量。反应体系为 20μL, 包括: 10μL TransStart® Top Green qPCR SuperMix(2×), 0.4μL PDIA3-RTF (10μmol/L), 0.4μL PDIA3-RTR (10μmol/L), 0.4μL ROX Reference DyeI(50×), 1.0μL cDNA, 7.8μL ddH₂O。反应程序为: 94°C 30s; 94°C 5s, 60°C 30s, 40 个循环; 95°C 15s, 60°C 1min, 95°C 15s。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算 PDIA3 基因相对表达量, 使用 SPSS 11.0 软件进行数据差异显著性分析。

1.3.7 SmPDIA3 完整 ORF 质粒克隆载体的构建 根据已得到的 SmPDIA3 序列全长, 利用 ORF Finder 在线软件找出其 ORF 区间, 设计引物扩增包含完整 ORF 在内的 1609bp 的 PCR 产物, 引物序列如表 1。PCR 体系为 20μL, 包括: 2× SeqAmp PCR Buffer 10μL, SeqAmp DNA Polymerase 0.4μL, 无菌水 7μL, ORF(F/R) 0.8μL/0.8μL, cDNA 1μL。PCR 反应条件如下: 94°C 5min; 94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 30s, 35 个循

环; 72°C 5min, 4°C 保存。反应产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 回收产物与 pEASY-T1 载体 25°C 连接 10min 后转化 Trans5 α 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选。挑取阳性单克隆, 经菌液 PCR 验证后条带大小合适的菌液样品送至生工生物工程(上海)有限公司测序。将测序结果正确的菌落, 接种于 5mL LB 液体培养基中(含 Amp)扩大培养, 使用 OMEGA 试剂盒提取质粒。

1.3.8 成熟肽基因的扩增和回收纯化 综合分析 pET-28a 载体的多克隆位点以及 SmpDIA3 ORF 序列中的限制性内切酶位点, 设计带有酶切位点的表达引物 MP(F/R)(表 1), 以 1.3.7 中提取的质粒作为模板进行 PCR 扩增, 反应产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收(PCR 体系及反应条件同 1.3.7)。

1.3.9 pET-28a 载体双酶切 构建酶切体系双酶切 pET-28a 载体, 体系共 50 μ L, 包括: 10 \times QuickCut Green Buffer 5 μ L, pET-28a 20 μ L, BamH I / Hind III 1 μ L, ddH₂O 23 μ L。根据 BamH I 和 Hind III 的不同反应温度, 实验时先在体系中加入 1 μ L BamH I, 轻轻混匀后瞬时离心, 30°C 水浴 15min; 再加入 1 μ L Hind III, 轻轻混匀后, 37°C 水浴 15min。反应结束后, 取 5 μ L 反应液与 5 μ L 未酶切载体, 琼脂糖凝胶电泳检测载体是否切开, 然后回收双酶切载体产物, 准备连接。

1.3.10 成熟肽基因片段与 pET-28a 载体的连接和转化 构建连接体系, 连接成熟肽基因和 pET-28a 酶切载体, 体系 10 μ L, 包括: 5X In-Fusion HD Enzyme Premix 2 μ L, DNA fragment 0.5 μ L, pET-28a 载体 2 μ L, ddH₂O 5.5 μ L。轻轻混匀上述试剂, 放入 PCR 反应仪中, 50°C 孵育 15min, 然后置于冰上。取 2.5 μ L 反应液转入 50 μ L 刚解冻的 Trans5 α 感受态细胞中, 冰浴 25min; 然后 42°C 水浴热激 30s, 取出放在冰上 2min; 加入 250 μ L LB 液体培养基(无抗性), 恒温培养箱中 37°C、200r/min 震荡培养 1h; 取 200 μ L 菌液均匀涂布在 LB 固体培养基平板(Kan⁺)上, 37°C 恒温过夜培养。第二天挑取单菌落, 接种于 LB 液体培养基(Kan⁺)中, 37°C、200r/min 恒温培养 6h; 以菌液为模板, T7 和 T7ter 为通用引物进行 PCR, 电泳检测质粒中插入片段的长度大小, 将符合条件的菌液测序。测序结果正确的菌落, 扩大培养后提取质粒, 命名为 pET-28a-PDIA3, 分装保存于-20°C 备用。

1.3.11 重组质粒转化表达菌株 取上述提取的重组质粒 pET-28a-PDIA3 1 μ L 转入 100 μ L 刚解冻的

E. coil transsetea(DE3)大肠杆菌感受态细胞中, 冰浴 25min, 接着 42°C 水浴热激 30s, 然后立即放在冰上; 取 50 μ L 菌液均匀涂布在 LB 固体培养基上(Kan⁺), 在 37°C 恒温培养箱中过夜培养, 第二天挑取阳性菌落接入 2mL LB 液体培养基(Kan⁺)中, 37°C、200r/min 震荡培养 8h, 用以下步实验诱导蛋白表达。同样操作转化 pET-28a 载体和 DE3 感受态细胞, 留做空白对照。

1.3.12 pET-28a-PDIA3 在大肠杆菌中的诱导表达 将目的菌液接种 100 μ L 于 5mL LB 液体培养基中(Kan⁺), 28°C、150r/min 震荡培养至菌液的 OD_{600nm} 约为 0.6 时, 吸取 1mL 作为空白对照, 在剩余的菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 两组继续震荡培养 6h。将两组菌液各取 1mL, 室温 5000r/min 离心 10min 收集菌体, 加入 320 μ L 的 PBS 缓冲液充分重悬菌体, 然后在冰浴条件下进行超声波破碎; 超声完成后, 空白组得到细胞破碎液既可, 诱导处理过的菌体破碎液则 4°C、12000r/min 离心 5min, 分别收集上清和沉淀(包涵体)。同样操作处理转化 pET-28a 空载体的菌液, 收集 IPTG 诱导前后的细胞破碎液。利用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 pET-28a-PDIA3 在大肠杆菌中的主要表达形式。

1.3.13 SDS-PAGE 凝胶电泳检测方法 将上述收集得到的上清、沉淀(用 PBS 重悬)及超声破碎的菌液各取 40 μ L, 加入 10 μ L 5 \times SDS Loading Buffer, 99°C 加热 10min, 3000r/min 离心后放冰上冷却; 将 20 μ L 蛋白样品以及 10 μ L 蛋白 Marker, 依次加入各个点样孔, 连接电泳仪; 电泳程序为 120V、约 20min, 180V、约 40min; 电泳结束后, 小心取出凝胶用 0.25%的考马斯亮蓝染色 2—4h; 然后弃去染色液, 用蒸馏水漂洗几次后脱色; 脱色期间可以更换几次脱色液, 待可以观察到清晰的蛋白质条带为止。

1.3.14 目的融合蛋白的分离纯化 将目的菌液的培养体系扩增至 200mL, 按照温度 28°C、转速 150r/min、IPTG 终浓度 0.5mmol/L 的条件进行目的蛋白诱导。诱导表达 6h 后, 参照 1.3.12 操作收集上清, 用孔径为 0.22 μ m 的滤膜进一步去除菌和杂质。得到的上清小心加入装填有镍离子螯合亲和层析树脂填料的柱子中, 反复上样 4 次后, 将柱子在 4°C 堵口静置 30min, 使目的蛋白和填料更好地结合。然后用 30mL 预冷的 10mmol/L、20mmol/L 的咪唑溶液清洗杂蛋白, 用 30mL 预冷的 30mmol/L 咪唑溶液, 洗脱目的蛋白, 收集流出液。

1.3.15 目的蛋白的透析、浓缩和浓度测定 选择截留分子量为 8000—14000Da 的透析袋, 剪出 3 条 10cm 长的小段, 用含有 10mmol/L NaHCO_3 和 1mmol/L EDTA 的溶液, 将其煮沸 30min 进行除杂, 随后用大量无菌水洗净, 将待透析的蛋白溶液加入透析袋中, 两端用透析夹加紧, 防止漏液。放入预冷的 PBS 缓冲液中, 辅以磁力搅拌器 4°C 透析, 每 12h 更换一次透析液, 更换 6—7 次。透析结束后, 将透析袋取出置于冰上, 正反面均匀铺上 PEG 20000 白色薄片进行浓缩, 每 30min 换一次 PEG 20000, 直至透析袋内液体体积为 3—4mL, 用 0.22 μm 滤膜抽滤除菌, 分装保存。浓缩得到的蛋白溶液, 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书的操作方法, 测定其在 562nm 处的吸收值, 并与标准曲线对比, 即可计算待测蛋白的浓度。

1.3.16 目的蛋白的 Western blot 检测 取 20 μL 1.3.14 中纯化的目的蛋白, 按照 1.3.13 的步骤进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 切除多余凝胶(染料部分和浓缩胶部分)量好尺寸, 将裁切好的凝胶放入提前准备好的预冷的电转液中, 并裁取与凝胶大小相同的 PVDF 膜以及两块滤纸。PVDF 膜需要在甲醇中浸泡十几秒使其带上正电, 随后将膜与滤纸一同放入电转液中, 浸泡十几分钟, 按照阳极、滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸、负极的顺序, 小心转入电转仪, 每放一层注意加入少量的电转液湿润, 并注意赶出气泡, 摆放好后接通电转仪, 15V 恒压电转 1h。电转完成后, 小心取出膜放入提前准备好的封闭液中, 室温摇床摇动封闭 2h。回收封闭液, 将膜放入按照 1:5000 用抗体稀释液稀释的一抗中, 4°C 过夜。回收一抗并洗膜, 用 25mL PBST 室温下在摇床上摇动洗涤, 每次 5min, 重复 4 次。将洗过的膜, 放入按照 1:10000 稀释的二抗中, 室温摇动孵育 1h, 重复 2 次。最后按照 DAB 显色试剂盒说明书要求, 在暗室将显色工作液加入膜上, 将膜覆盖, 37°C 震荡反应 10min 左右, 即有浅棕色条带出现。

1.3.17 目的蛋白的活性验证 余秀娟等(2013)发现包括分子伴侣在内的许多小分子添加剂在变性蛋白体外复性过程中能够起到重要的作用。因而本实验将浓缩得到的 SmPDIA3 蛋白加入变性溶菌酶的复性体系中, 观察其是否促进变性溶菌酶的正确折叠, 发挥分子伴侣的功能, 从而验证其蛋白活性。实验设计参照贾长虹(2007)及刘慧萍等(1998)稍作改动: 取 20 μL 20mg/mL 的溶菌酶溶液加入 30 μL 1mol/L 的 DTT、130 μL 8mol/L 的盐酸胍和 20 μL 1mol/L 的 PBS

混匀后在 37°C、120r/min 条件下变性 4h, 然后取 10 μL 变性液加水稀释至 100 μL , 混匀后 37°C 复性 2h, 为实验组 1; 取 10 μL 变性液加 40 μL 10mmol/L 的 GSSG、20 μL 10mmol/L 的 GSH、10 μL 1mol/L 的 PBS 和 20 μL 的 H_2O , 混匀后 37°C 复性 2h, 为实验组 2; 将实验组 2 中 20 μL 的 H_2O 替换成 20 μL 的 SmPDIA3 蛋白作为实验组 3; 另取 10 μL 20mg/mL 的溶菌酶溶液稀释 100 倍, 37°C 放置 6h 作为对照组。取四组溶液各 20 μL , 按照溶菌酶(LZM)测试盒说明书的要求测量它们在 530nm 处的透光度, 根据各组的透光度, 计算出不同实验组相较于对照组的复性程度。

2 结果

2.1 大菱鲂 SmPDIA3 基因的 cDNA 克隆及序列分析
大菱鲂 PDIA3 基因 cDNA 序列全长为 2083bp, 其中开放阅读框为 1479bp, 5'非编码区(UTR)和 3'非编码区分别为 85bp 和 519bp。其中 3'UTR 区域含有典型的加尾信号 AATAAA 和 polyA 尾(图 1)。该基因 ORF 可编码一个由 492 个氨基酸残基组成的蛋白质, 相对分子质量为 54.92kDa, 理论等电点为 5.40, 包含一个由 17 个氨基酸组成的信号肽和两个活性位点 WCGHCK。目前该基因序列已经提交至 NCBI, GenBank 登录号: MG765516。

2.2 SmPDIA3 的氨基酸序列分析

使用 SOPMA 在线软件预测蛋白的二级结构, 结果发现 SmPDIA3 有四种二级结构, 包括 36.79%的 α 螺旋(Alpha helix)、19.51%的 β 折叠(Extended strand)、38.62%的无规则卷曲(Random coil)和 5.08%的 β 转角(beta turn)。如图 2 所示, 蓝线、红线、绿线和紫线分别表示 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲。

使用 SWISS 蛋白序列分析软件, 推测出大菱鲂 SmPDIA3 蛋白的高级结构(图 3)。

2.3 同源性比较和进化分析

利用 DNAMAN 软件对大菱鲂 SmPDIA3 氨基酸序列与其他物种该蛋白序列比对结果显示: 大菱鲂与尖吻鲈和高体鲮的 PDIA3 最为相似, 同源性分别为 89.54%、88.73%; 与原鸡、智人、家兔、非洲爪蟾的同源性较低, 分别为 71.49%、71.68%、72.11%、71.12%; 与黑腹果蝇的同源性最低, 为 47.40%(图 4)。利用 MEGA6.0 以邻接法(Neighbor-joining)构建大菱鲂 SmPDIA3 系统进化树, 结果显示: 大菱鲂与牙鲆、大黄鱼进化关系上聚为一支, 与鱼类亲缘关系最近(图 5)。

	CACATCGTACTACGTTTTTTTTGTT	25
	TTTCCTTCTGTTATAGCAGAAAGTGAAGGAGGCTTTTTTTTAAGTTAACGGGTGTGCG	85
	ATG TTGAGACTGATCTTCTTGCCGCCCTCGCCGGGTGCACCCGGGCCAGTGATGTGCTG	145
1	M L R L I F L A A L A G C T R A S D V L	
	GAGTACACGGATGACGATTCGAAAGCAAGATCGGAGTCCACGATCTCATTCTTGTGGAA	205
21	E Y T D D D F E S K I G V H D L I L V E	
	TTCTTTGCCCATGGTGTGGCCACTGTAAGCGGCTAGCACCTGAGTATGAGGCGCCGCC	265
41	F F A P W C G H C K R L A P E Y E A A A	
	ACACGGCTGAAAGGCATCGTCCCTATAGCCAAGTTGACTGCACTCCAGCAGCAACGTA	325
61	T R L K G I V P I A K V D C T S S S N V	
	TGCAGCAAATACGGTGTAGTGGCTACCCAACCCTGAAGATCTTCAGGGACGGAGAAGAC	385
81	C S K Y G V S G Y P T L K I F R D G E D	
	TCTGGACCCTACGATGGACCCAGAACAGCAGACGGGATTGTCAGCTTCCTAAAGAAGCAG	445
101	S G P Y D G P R T A D G I V S F L K K Q	
	GCTGGCCAGCTTCTGTGGAGCTCAAGGCTGAGGCAGACTTTGACAAGTATGTTGCTGAA	505
121	A G P A S V E L K A E A D F D K Y V A E	
	CAAGACGCAAGTGTGTGGGTTCTTTGCTCCTGACGAGACACATCACAGGCAGAGTTC	565
141	Q D A S V V G F F A P D E S T S Q A E F	
	CTGAAGGCAGCCAGCCCTGAGGGACAACATCGCTTCGCCACACCAACTCCGAGGCG	625
161	L K A A S A L R D N Y R F A H T N S E A	
	CTCCTCCAGAGCCAAGGCATCGACGGAGAAGGAGTCGTCCTGTTCCGCCACCACGCCTT	685
181	L L Q S Q G I D G E G V V L F R P P R L	
	AACAACAAGTTTGAAGACAGCTCCGTCAAATACACAGAGGAACATTCACCAGCATCAAG	745
201	N N K F E D S S V K Y T E G T F T S I K	
	ATCAAGAAGTTCATTAGGATAACATCTTTGGGATTTGCCCCACATGACAGACGACAAC	805
221	I K K F I Q D N I F G I C P H M T D D N	
	AAAGACCAGCTGAAGAGCAAAGACCTGTTGGTGGCTTATTATGACGTTGACTACAACAAA	865
241	K D Q L K S K D L L V A Y Y D V D Y N K	
	AACCCCAAGGGCTCAAACACTGGAGAACAGGGTATGAAGGTGGCGAAGAGTTTCTG	925
261	N P K G S N Y W R N R V M K V A K S F L	
	GATCAGGAAAGAAGCTGAACTTCGCCGTGGCCAACAAGAACATGTTACAGCCACGACGTG	985
281	D Q G K K L N F A V A N K N M F S H D V	
	TCCGAGTTCGGCTGGACGGCAGCTCGGGGAGTTGCCCTGGTGGCCATCCGACCACC	1045
301	S E F G L D G S S G E L P L V A I R T T	
	AAGGGAGACAAATACGTATGCGCGAGGAATTCTCTCGTATGAAAAACTCTGGAGCGT	1105
321	K G D K Y V M A E E F S R D G K T L E R	
	TTCTGCAGGACTACTTTGATGACAGTTGAAGCGCTATCTCAAATCCGAGCCATCCCA	1165
341	F L Q D Y F D G T L K R Y L K S E P I P	
	GAGGACAACGACGGACCTGTCAAGTCTTGGTGGCAGAGAACTTCGACTCCATCGTCAAC	1225
361	E D N D G P V K V L V A E N F D S I V N	
	GACGACAGCAAAGATGACTGATCGAGTTTACGCCCGTGGTGGCAGACTGCAAGAGC	1285
381	D D S K D V L I E F Y A P W C G H C K S	
	CTGGAGCCCAAATACAACGAGCTGGGAGAGAAGCTGGCCGATGATCCCAACATTGTCATT	1345
401	L E P K Y N E L G E K L A D D P N I V I	
	GCCAAGATGGACCCACGCCAACGATGTGCCATCTCCATATGAAGTCAGCGGATCCCC	1405
421	A K M D A T A N D V P S P Y E V S G F P	
	ACAATCTTCTCCCTGCTGGACGTAAGATGAACCCAAAGAAATACGAGGGTGGTCTG	1465

```

441  T I F F S P A G R K M N P K K Y E G G R
    GAAGTGAGCGACTTCTCTCTACCTGAAGAGAGAGGCTCCAACCCCGTGGTGGTGCGAG 1525
461  E V S D F L S Y L K R E A S N P V V V Q
    GAGGAGGCCAAGAAGAAAAAGAAGAGGATTGAGCTAATAAGCACCAACAGGAACCTCTA 1585
481  E E A K K K K K R I E L *
    CATCCCCCATTGGACAGGAGGAGTTTGGGGAAATCCATGCAGAGAAAGAACTAAATT 1645
    ATATTCCACTTTCTTAGTGAACCTACCGAATGCTCTGAAGCCAAGTCAAAAAGACGCGGCC 1705
    CCCCCTTAGGTCTCCGCCGCTCTGGGAAACTGTGGAAGGTGGAGAGGTGGTGGCCAG 1765
    GGCCTGCCTCATGTTAAAAACAAAAACAATTTTGGGGAAGTGGGGACAGCTTTTGTGA 1825
    AATATTGAGATTTTATTCCCTTGGTTTGATATCTACACCTCAGGCTGATGCACTTTG 1885
    GCTTTGTTGTGACACAGTCATCTGTCGCTTTGGTTTTTGTGTTGTCGTCACGGGATAA 1945
    TGGTAATGGTGAATTCCTTTTCTTTTCTTTTTTTTCTGTTTTTGTAAACAGTTTT 2005
    TGTTTTGTACATTTGGAAGGATTATGAAATAAATGGCCACAAAACCAAAAAAAAAAAAA 2065
    AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2083

```

图 1 SmPDIA3 cDNA 及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acids sequence of SmPDIA3

注: 起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 均用粗线方框标出, WCGHCK 活性位点和加尾信号 AATAAA 分别用灰色阴影和下划线标出, 信号肽用青色阴影标出

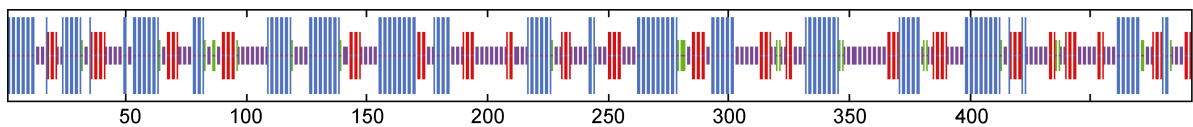


图 2 SmPDIA3 蛋白质的二级结构预测

Fig.2 The secondary structure of SmPDIA3 subunit protein

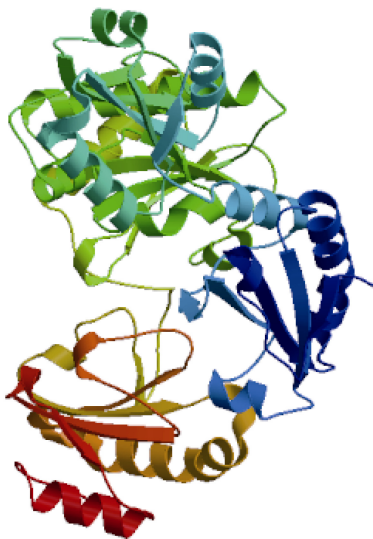


图 3 SmPDIA3 蛋白质的三级结构预测

Fig.3 The deduced tertiary structure of SmPDIA3 subunit protein

2.4 大菱鲂 SmPDIA3 基因的组织表达分析

利用 RT-PCR 技术分析大菱鲂 SmPDIA3 基因在肝脏、鳃、皮肤、肠、肾脏、心脏、脾、脑 8 个组织

中的相对表达量(图 6), 结果显示, PDIA3 基因在各种组织中广泛表达, 但表达量存在显著差异。其中在肝脏中表达量最高($P < 0.05$), 肠和鳃次之, 在脑中表达量最低。

2.5 温度胁迫后 SmPDIA3 基因的在肠和肝脏组织中的表达分析

不同温度胁迫后, SmPDIA3 在肠和肝脏组织中的相对表达量总体呈上调表达趋势, 在 25°C 时有所下降, 在 28°C 时达到最大值(图 7)。

2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳、蛋白纯化及 Western blot 检测结果

电泳结果如图 8 所示, pET-28a-PDIA3 转化的 DE3 大肠杆菌经 IPTG 诱导后, 总蛋白在 44.3—66.4kDa 之间有一条特异性条带, 符合我们对表达蛋白的预测结果(56kDa), 且目的蛋白主要在上清中表达; 对上清进行纯化后, 得到的目的蛋白条带单一, Western blot 检测结果显示, 重组的 pIgR-ED 蛋白可以与 anti His-tag 的 IgG 发生特异性的免疫反应, 进一步说明重组蛋白得到了正确的表达及纯化。

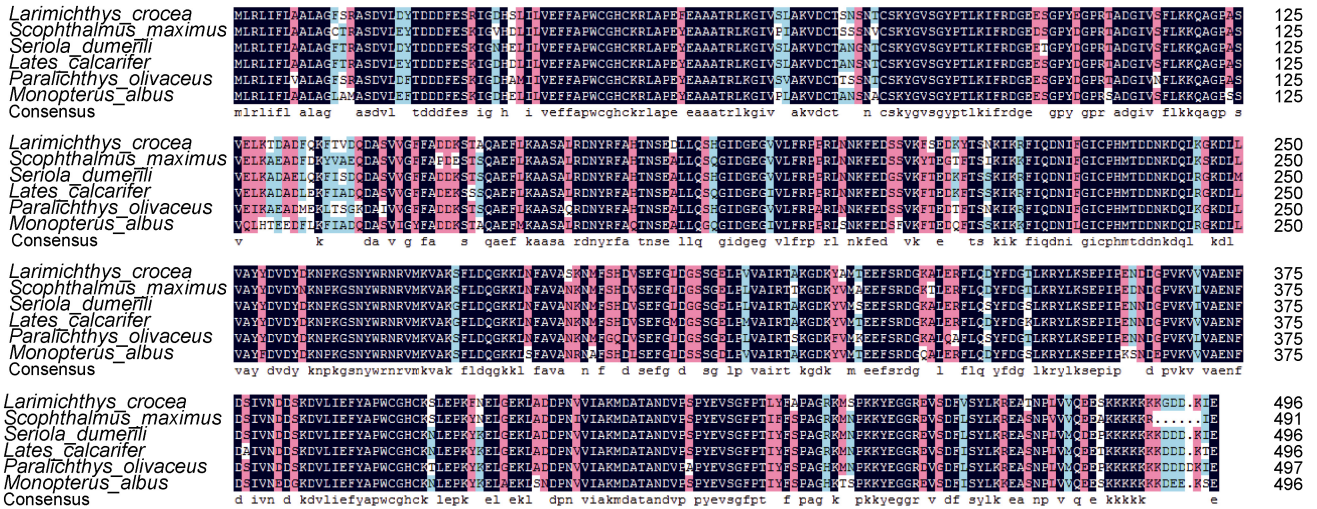


图 4 大菱鲂 SmPDIA3 与其他物种的氨基酸序列比对

Fig.4 Amino acid sequence alignment of turbot SmPDIA3 in comparison against those of other species

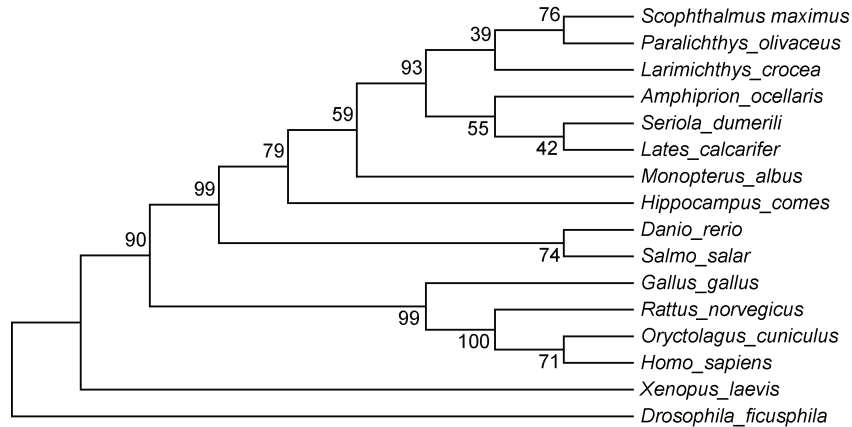


图 5 基于 SmPDIA3 基因氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig.5 The NJ tree based on SmPDIA3 gene amino acid sequences

注: *Scophthalmus maximus*: 大菱鲂(MG765516); *Paralichthys olivaceus*: 牙鲆(XM_020079362.1); *Lates calcarifer*: 尖吻鲈(XM_018685667.1); *Monopterus albus*: 黄鳝(XM_020625350.1); *Amphiprion ocellaris*: 眼斑双锯鱼(XM_023272623.1); *Hippocampus comes*: 虎尾海马(XM_019873978.1); *Danio rerio*: 斑马鱼(BC044524); *Salmo salar*: 大西洋鲑(FJ457023); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾(NM_001086582.1); *Gallus gallus*: 原鸡(NM_204110.3); *Rattus norvegicus*: 褐家鼠(NM_017319.1); *Oryctolagus cuniculus*: 家兔(NM_001171315.1); *Homo sapiens*: 智人(NM_005313.4); *Drosophila ficusphila*: 黑腹果蝇(XM_017194392.1); *Seriola dumerilii*: 高体鲷(XP_022612013.1); *Larimichthys crocea*: 大黄鱼(XP_010733510.1)

2.7 目的蛋白的浓缩和活性检测

利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓缩蛋白的浓度为 243.18μg/mL。由图 9 结果可知, 溶菌酶变性 4h 后完全失活, 而在复性体系中添加 CON 一定量的氧化还原剂(GSSG/GSH)则能稍微促进溶菌酶的复性, 复性率为 14.12%; 当在氧化还原剂存在的条件下加入浓缩的 SmPDIA3 蛋白则能显著提高其复性率, 达到 47.42%, 比只有氧化还原剂存在时提高了 3.36 倍。上述结果表明了 SmPDIA3 蛋白在溶菌酶的复性过程中起到了明显的分子伴侣功能。

3 讨论

研究中, SmPDIA3 基因在大菱鲂肝脏和肠中的表达量随着温度的升高先升高再降低再升高, 在 28°C 时达到最大值。目前 PDIA3 在鱼类肠道中的作用还没有研究, 但已有学者发现其可能在小鼠肠粘膜中通过介导树突状细胞激活 T 淋巴细胞, 导致肠粘膜的异常免疫应答, 从而促进肠易激综合征(IBS)的发生(马丽娟等, 2011; Zhuang *et al*, 2015)。另一方面, Chen 等(2011)发现, 黄鳍鲷肝组织暴露于甲基对硫磷

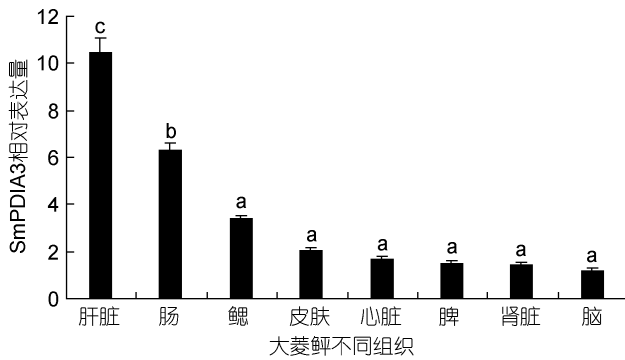


图6 大菱鲂 SmPDIA3 基因在不同组织中的表达分布状况

Fig.6 The expression of the SmPDIA3 gene in different tissues

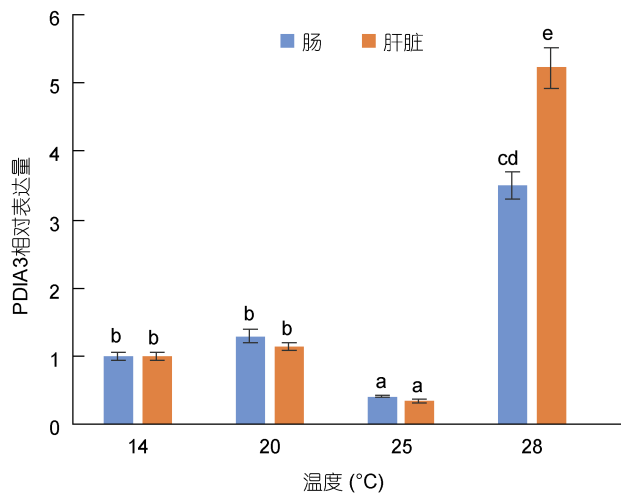


图7 大菱鲂 SmPDIA3 基因在肝脏和肠组织中高温胁迫后的表达变化情况

Fig.7 The expression of PDIA3 gene of turbot in the liver and intestine after thermal stress

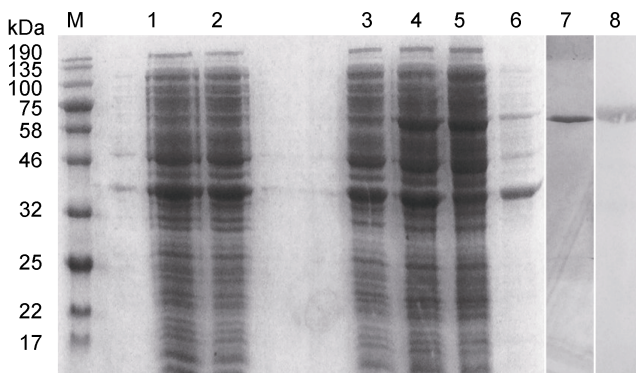


图8 蛋白表达结果检测

Fig.8 Detection of protein expression

注: M: 蛋白 Maker; 1: 细胞破碎液(pET-28a, 未诱导); 2: 细胞破碎液(pET-28a, 诱导); 3: 细胞破碎液(pET-28a-PDIA3, 未诱导); 4: 细胞破碎液(pET-28a-PDIA3, 诱导); 5: 上清(pET-28a-PDIA3, 诱导); 6: 沉淀(pET-28a-PDIA3, 诱导); 7: 纯化后的目的蛋白; 8: 纯化后的蛋白 Western blot 结果

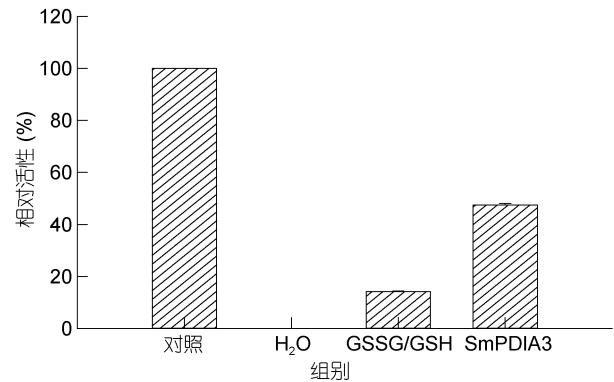


图9 溶菌酶的复性结果

Fig.9 The lysozyme renaturation results

后, 其 PDIA3 表达水平增加; Huang 等(2009)发现大西洋鲑鱼 PDIA3 mRNA 主要在肝脏中表达, 高锰酸钾氧化条件下, 其肝脏中 PDIA3 含量显著增加; Sever 等(2013)发现虹鳟 PDIA3 在肝脏和卵子中具有最高表达, 在响应免疫刺激如双链 RNA 或植物血凝素时上调。因此可以推测, 大菱鲂受到高温胁迫时, PDIA3 在肠和肝脏中的上调差异表达可能与其免疫功能及氧化还原功能相关, 对鱼体高温应激起到重要作用。

本研究利用原核表达技术, 将克隆得到的 SmPDIA3 基因成熟肽序列连接到 pET-28a(+)载体上, 再转入 DE3 感受态细胞中进行诱导表达, 最后得到分子量约为 56kDa 的重组蛋白, 与刘群等(2015)对日本血吸虫 PDIA3 蛋白的原核表达研究结果相似。不同的是, 本研究中 SmPDIA3 蛋白主要在上清中表达, 而日本血吸虫 PDIA3 蛋白则主要以包涵体的形式存在于沉淀中。分析原因, 虽然两者使用同样的载体和表达菌, 但是诱导条件不同。本研究中诱导表达时温度为 28°C、IPTG 终浓度为 0.5mmol/L, 而刘群等诱导时温度为 37°C、IPTG 终浓度为 1mmol/L, 猜测是因为较高的温度和 IPTG 浓度使目的蛋白表达过快, 导致二硫键配对混乱, 造成大量的重组目的蛋白不能正确折叠, 从而以聚集的形式表达形成没有生物活性的包涵体沉淀。

本研究通过变性溶菌酶的复性实验对 SmPDIA3 蛋白进行了功能验证, 结果证明在变性蛋白的复性过程中, 该蛋白可作为分子伴侣辅助变性蛋白的正确折叠, 从而发挥着重要的作用。因其显著的分子伴侣功能, 推测其可作为包涵体透析复性的重要添加剂, 或作为有效的蛋白质促进剂用于生产中大规模的蛋白复性。目前关于体外原核表达 PDIA3 蛋白的研究很多, 但对其蛋白功能的报道较少, 本研究可为

进一步探索 PDIA3 蛋白的功能提供一定的思路和研究基础。

4 结论

本研究利用 RACE 技术首次克隆了大菱鲂 SmPDIA3 基因 cDNA 全长序列, 通过 qPCR 分析了其在大菱鲂不同组织中的分布情况及不同温度胁迫下在肠和肝脏中的表达变化, 然后构建原核表达载体在上清中表达了 SmPDIA3 目的蛋白, 并通过 Western blot 技术验证了目的蛋白的准确性, 利用 BCA 蛋白浓度测定方法得到浓缩蛋白的浓度, 最后通过溶菌酶的复性实验验证了 SmPDIA3 蛋白的分子伴侣功能。该研究为分析大菱鲂应答高温胁迫的分子机理奠定基础, 为大菱鲂耐高温遗传育种新标记的开发提供新的理论基础和研究方向, 并为 PDIA3 蛋白功能的研究拓宽了思路。

参 考 文 献

- 马丽娟, 吕 宾, 孟立娜等, 2011. PDIA3 在腹泻型肠易激综合征患者结肠黏膜中的蛋白表达及其意义. 胃肠病学, 16(4): 218—221
- 王 婷, 黄智慧, 马爱军等, 2014. 基于转录组数据的大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) SNP 标记开发及多态性分析. 海洋与湖沼, 45(6): 1300—1307
- 王 璐, 2012. 蛋白二硫键异构酶 ERp57 调控血小板活化和血栓形成的作用及其机制研究. 苏州: 苏州大学硕士学位论文
- 吕利霞, 汤睿智, 邢万金, 2010. PDIA3 的结构与功能及其在精卵融合过程中的作用. 生物技术通报, (3): 31—34, 49
- 刘 群, 段明明, 苑纯秀等, 2015. 日本血吸虫 PDIA3 的原核表达和多抗血清制备. 中国动物传染病学报, 23(1): 33—38
- 刘慧萍, 陈苏民, 1998. 蛋白质二硫键异构酶结构域的克隆与活性研究. 见: 材料科学与工程论文文集. 北京: 中国科学技术协会
- 李 勇, 孙国祥, 柳 阳等, 2011. 温度对高密度循环海水养殖大菱鲂摄食、生长及消化酶的影响. 渔业科学进展, 32(6): 17—24
- 余秀娟, 赵丽艳, 张晓光, 2013. 体外蛋白质复性方法及小分子添加剂在复性过程中的作用. 河北北方学院学报(自然科学版), 29(2): 9—15
- 胡 玥, 陶丽媛, 吕 宾, 2015. 蛋白质二硫键异构酶 A3——疾病治疗的新靶点. 中国病理生理杂志, 31(6): 1145—1149
- 贾长虹, 2007. 人工伴侣与小分子添加剂协同辅助变性溶菌酶复性的研究. 天津: 天津大学硕士学位论文
- 高淳仁, 王印庚, 马爱军等, 2006. 温度对大菱鲂幼鱼生长、成活率和体内蛋白酶活性的影响. 海洋水产研究, 27(6): 33—36
- 郭建丽, 田岳强, 马爱军等, 2015. 大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 抗鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 性状的微卫星分子标记研究. 海洋与湖沼, 46(1): 157—164
- Aureli C, Gaucci E, Arcangeli V *et al*, 2013. ERp57/PDIA3 binds specific DNA fragments in a melanoma cell line. Gene, 524(2): 390—395
- Chen H B, Huang H Q, 2011. Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in *Sparus latus* liver. Fish & Shellfish Immunology, 30(3): 800—806
- Ellerman D A, Myles D G, Primakoff P, 2006. A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. Developmental Cell, 10(6): 831—837
- Freedman R B, Hirst T R, Tuite M F, 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. Trends in Biochemical Sciences, 19(8): 331—336
- Guo G G, Patel K, Kumar V *et al*, 2002. Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. Journal of Interferon & Cytokine Research, 22(5): 555—563
- Huang T S, Olsvik P A, Krøvel A *et al*, 2009. Stress-induced expression of protein disulfide isomerase associated 3 (PDIA3) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 154(4): 435—442
- Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H *et al*, 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. Fish & Shellfish Immunology, 22(6): 686—694
- Pendyala G, Ninemire C, Fox H S, 2012. Protective role for the disulfide isomerase PDIA3 in methamphetamine neurotoxicity. PLoS One, 7(6): e38909
- Sever L, Bols N C, Dixon B, 2013. The cloning and inducible expression of the rainbow trout ERp57 gene. Fish & Shellfish Immunology, 34(2): 410—419
- Turano C, Coppari S, Altieri F *et al*, 2002. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. Journal of Cellular Physiology, 193(2): 154—163
- Zhang X Q, Pan Y, Yu C H *et al*, 2015. PDIA3 knockdown exacerbates free fatty acid-induced hepatocyte steatosis and apoptosis. PLoS One, 10(7): e0133882
- Zhuang Z M, Wang X T, Zhang L *et al*, 2015. The effect of PDIA3 gene knockout on the mucosal immune function in IBS rats. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(5): 6866—6877

EXPRESSION ANALYSIS AND FUNCTIONAL VERIFICATION OF PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE SMPDIA3 IN TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

TANG Qi-Zheng^{1,2,3}, SUN Zhi-Bin^{1,3}, WANG Xin-An^{1,3}, MA Ai-Jun^{1,3},
YANG Shuang-Shuang^{1,3}, HUANG Zhi-Hui^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract We cloned the SmpDIA3 gene of turbot *Scophthalmus maximus* using the SMART-RACE technique. The cDNA sequence of SmpDIA3 is 2083bp in length and includes a 1479bp open reading frame encoding a 492 amino acid signal peptide containing 17 amino acids. The predicted molecular weight is 54.92kDa, the theoretical isoelectric point is 5.40, and GenBank accession number is MG765516. Tissue expression analysis showed that SmpDIA3 gene was expressed in intestinal, iliac, liver, and other tissues, with the highest expression in the liver and the lowest in the brain. In addition, we studied the expression of SmpDIA3 gene in the intestine and liver tissues after a thermal stress. We found that the relative expression of SmpDIA3 gene increased with the increase of temperature, and reached the maximum at 28°C. Using prokaryotic expression technology, the pET-28a-PDIA3 prokaryotic expression vector was constructed and the target protein was successfully expressed in the supernatant. Finally, the refolding experiment of denatured lysozyme was designed to verify the function of the SmpDIA3 protein. We found that SmpDIA3 protein can assist the correct folding of denatured proteins, and has obvious molecular chaperone function.

Key words turbot *Scophthalmus maximus*; RACE; SmpDIA3; prokaryotic expression; molecular chaperone