

# 白肛海地瓜(*Acaudina leucoprocta*) 精氨酸激酶的基因克隆与表达\*

周 君<sup>1</sup> 李成华<sup>1</sup> 李 晔<sup>1</sup> 刘 艳<sup>1</sup> 金春华<sup>1</sup> 夏长革<sup>1</sup>  
李太武<sup>1,2</sup> 苏秀榕<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

**提要** 精氨酸激酶是调节能量代谢的重要酶类, 在无脊椎动物体内能量平衡过程中起重要作用。利用 PCR 扩增技术, 从白肛海地瓜的 cDNA 文库中克隆得到精氨酸激酶(arginine kinase)基因, 其全长为 2139bp, 包括 5'非翻译区(5'-UTR)序列 92bp, 3'端非翻译区(3'-UTR)序列 934bp 和 1113bp 的 ORF, 编码 371 个氨基酸, 预测分子量大小和等电点分别为 42.32kDa 和 7.19。构建了精氨酸激酶原核表达质粒并转化表达菌株, 经 IPTG 诱导表达后, 获得了与预期的分子量大小一致的表达产物。利用该目的蛋白制备了白肛海地瓜精氨酸激酶的特异性多克隆抗体, 经 Western blot 证明该蛋白为精氨酸激酶。

**关键词** 白肛海地瓜, 精氨酸激酶, 原核表达, 多克隆抗体

**中图分类号** Q346

白肛海地瓜(*Acaudina leucoprocta* H. L. Clark)是棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、芋参目(Molpadida)、尻参科(Caudinidae)、海地瓜属(*Acaudina*)动物。白肛海地瓜通常生活在 40—100m 深的海底淤泥中, 体色通常为茄赭色或暗紫色, 呈纺锤形, 长可达 28cm, 因此又称茄参、海茄子、海番薯等。白肛海地瓜营养丰富, 粗脂肪含量低且含有二十二碳六烯酸(DHA), 具有良好的降血脂功能和抗氧化活性(徐彩云等, 2009; 侯付景等, 2010)。近年来, 白肛海地瓜资源的开发日益增多, 但目前对其研究却不多, 主要集中在营养成分及功能及产品开发方面, 而分子生物学水平的进行研究, 目前还没有报道。对白肛海地瓜开展分子生物学研究, 无论是对其生物资源的保护, 还是生理功能研究等方面, 都是十分必要的。

精氨酸激酶(arginine kinase, AK)是无脊椎动物体内能量代谢相关的重要酶之一。作为一种磷酸原激酶, 它通过催化精氨酸与 ATP 之间的可逆反应, 将能

量存储于磷酸精氨酸中, 或将磷酸精氨酸分解成精氨酸和 ATP (Ellington, 1989)。精氨酸激酶通过可逆地催化调节 ATP 能量库的平衡外, 还影响质子库平衡, 细胞内能量转运过程与蛋白质的翻译后修饰, 一些生命活动都和精氨酸激酶相关(姚翠鸾等, 2008)。另有研究发现, 精氨酸激酶不仅在无脊椎动物适应不良环境的过程中发挥了重要作用, 还与机体的免疫反应关系密切, 可能间接或直接参与到免疫反应过程中(管越强等, 2009)。本研究克隆了白肛海地瓜精氨酸激酶基因, 并制备了精氨酸激酶的多克隆抗体, 经 Western blot 验证抗体的特异性, 可为进一步研究白肛海地瓜的能量代谢和宿主防御等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用白肛海地瓜购自象山县石浦码头。BALB/c 小鼠购自上海实验动物中心, 白肛海地瓜

\* 国家星火计划项目, 2010GA701063 号; 浙江省重点社会发展项目, 2009C03017-4 号; 宁波市科技局国际合作项目, 2008C500265 号。周 君, 博士研究生, E-mail: zhougundam@foxmail.com

通讯作者: 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-23, 收修改稿日期: 2011-12-14

cDNA 文库由实验室先期构建, 大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)和 DH5a 由实验室保存, 原核表达载体 pET-28a(+)购自 Novagen 公司, pMD18-T 载体、T4 连接酶、限制性内切酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海捷瑞公司, 其它常规试剂购于上海生工生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 精氨酸激酶基因的克隆

白肛海地瓜 cDNA 文库测序后, 经比对分析, 得到与已知物种精氨酸激酶基因相似的片段。根据该片段序列设计扩增 5'端和 3'端的引物: AKP<sub>1</sub>(5'-ATCCTTAGCGGCGT ATTTC-3')和 AKP<sub>2</sub>(5'-AGTGTAGGAGGCGTCTATG AT-3'), 分别和 cDNA 文库载体 pBluescript SK II(+ )上的 T3 和 T7 引物进行 PCR 扩增。扩增后的片段经胶回收与 pMD18-T 载体连接, 转化至 DH5a 并涂板, 过夜培养后挑取单菌落进行 PCR 检测, 之后将阳性克隆送上海英骏生物科技有限公司测序。序列拼接得到白肛海地瓜精氨酸激酶全长序列, 使用 <http://kr.expasy.org/tools/>网站中的工具分析蛋白质的基本理化性质; NCBI 网站中的 BlastX 比对序列相似度, 采用 MEGA 3 软件构建系统进化树。

### 1.2.2 原核表达质粒的构建和诱导表达

DNASTar 软件分析拼接得到白肛海地瓜精氨酸激酶全长序列, 获得其 ORF 区域, 设计原核表达引物 BDAKF (5'-CGCGGATCCATGGCCAACCTCAAC-3')和 BDAKR (5'-CCCAAGCTTTTACTTAGGAATGAG-3')扩增白肛海地瓜精氨酸激酶基因的 ORF 序列。扩增产物经胶回收纯化和 pET-28a(+)空载体同时用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 产物经胶回收纯化后, T4 连接酶连接构建重组表达载体 pET-AK。测序验证序列后, 转化至感受态细胞 BL21(DE3), 挑取阳性克隆, 经 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 取菌液经超声波破碎, SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测表达情况。

### 1.2.3 多克隆抗体的制备和 Western blot 分析

含外源基因的大肠杆菌经诱导后进行 SDS-PAGE 电泳分离, 凝胶经 0.25mol/L KCl 溶液浸泡, 待显示出目的条带后切下并加入适量的 PBS 缓冲液研磨, 4℃ 静置过夜, 使目的蛋白充分溶解。腹腔注射免疫 5 周龄的雄性 BALB/c 小鼠, 前 3 次注射间隔一周, 第三次注射后 3d, 进行最后一次注射, 眼球取血制备抗血清, 其中含有抗重组 AK 的多克隆抗体。按照 Su 等(2009)的方法, 用 Western blot 检测多抗。

## 2 结果

### 2.1 精氨酸激酶基因全长序列

根据文库中获得的片段序列设计特异引物进行基因两端的扩增, 测序后获得的序列与已知片段进行拼接, 得到了白肛海地瓜精氨酸激酶全长 cDNA 序列(图 1)。其全长为 2139bp, 包括 5'非翻译区(5'-UTR)序列 92bp, 3'端非翻译区(3'-UTR)序列 934bp 和 1113bp 的 ORF, 编码 371 个氨基酸, 预测分子量大小和等电点分别为 42.32kDa 和 7.19。

利用 ExPasy 网站的 PredictProtein 在线工具分析, 结果显示预测蛋白质存在 N-糖基化位点 NGTD, N-豆蔻酰化位点 3 个, 依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 KRGT, 蛋白激酶 C 磷酸化位点 4 个, 酪蛋白激酶磷酸化位点 7 个, 酪氨酸激酶磷酸化位点 8 个和磷酸原激酶活性位点标签 CPSNLGT; SignalP 分析 5'端无信号肽。以用 NCBI 的 Blastp 功能将白肛海地瓜精氨酸激酶与已报道的各种精氨酸激酶进行同源性分析, 结果表明白肛海地瓜精氨酸激酶序列与仿刺参(*Apostichopus japonicus*)精氨酸激酶同源性最高, 为 91%; 与棘皮动物门中的紫石海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)同源性为 72%; 与海葵(*Nematostella vectensis*)同源性为 64%。将白肛海地瓜精氨酸激酶与已报道的部分精氨酸激酶和肌酸激酶进行同源性分析(图 2)发现, 白肛海地瓜精氨酸激酶与同纲的刺参遗传距离最近, 包括白肛海地瓜在内的三个棘皮动物门物种聚为一支, 相对于其它无脊椎动物的精氨酸激酶, 棘皮动物门与脊椎动物的肌酸激酶亲缘关系更近。

### 2.2 原核表达

构建重组质粒 pET-AK 并测序验证序列, 结果显示插入的外源片段正确。重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3)中经 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达后, 通过 SDS-PAGE 电泳分析, 样品在相对分子质量 44.3kDa 附近可见明显的条带(图 3), 而且随着诱导时间的增加, 条带加深, 表达量增加。精氨酸激酶的预测分子量为 42.32kDa, 因为表达质粒 pET-28a(+)在多克隆位点上游有一段编码序列, 分子量约为 3.5kDa, 所以重组蛋白约为 45.82kDa, 这与电泳结果相符。而阴性对照和未诱导的样品在该位置上并没有出现条带。

### 2.3 Western blot 检测基因原核表达

免疫小鼠并制备的抗血清含重组白肛海地瓜 AK(recombinant *A. leucoprocta* AK, rALAK)的多克隆

```

TCGAGGTCGCGTCCGGAACATATCTCTCTCTTGTATCTGCAAAATAGTCGTCGGGCATTGAAGCCTGTACTA
100 ACCGTTTCAGTGTCAACCATGGCCAACTCAACCAAAAAGAAATACGCCGCTAAGGATGATTACCCAAATTTGAAG
150      M A N L N Q K K Y A A K D D Y P N F E
225 GTCACAAGAGCTTGTGGCAAAGTACTTGAAGCTGACATGTACGCCGACTTCGCGATGTTACACACCAAGCG
G H K S L L A K Y L K A D M Y A R L R D V Y T P S
300 GTTACACAATCGATAGGCCATCCAAAATGGCACAGATAATCCAGATTTCCATTTGGGTCTCCTAGCCGGTGACG
G Y T I D R A I Q N G T D N P D F H L G L L A G D
375 AAGAAACATACAGTGTCTTCGCTGAACATTTTCGATCCGGTCATTGAAGATACCACAACGGATTTAAGAAAACCG
E E T Y S V F A E L F D P V I E E Y H N G F K K T
450 ACAACCACAAAACCGATTTGGATGTCAAGAAGTTCTGGATGATGTTCTGGACGCCAAGTATGTCATCAGCTCCA
D N H K T D L D V K K V L D D V L D A K Y V I S S
525 GAATACGAACCCGACGCAACATTCGTGGGTCTGCCTCTCTCCTCACACTACCCGGGGTGAAGGAGGGCTGTAG
R I R T G R N I R G F C L S P H T T R G E R R A V
600 AGAAAATGGTATCTGAAGCGCTGAATTCACTGGGTGGTGTATCTGAAGGGCAAATACTATTCCTACAAAAGATGG
E K M V S E A L N S L G G D L K G K Y Y S L Q K M
675 ACGAGAAGACCCAGCAACACTGATCGACGATCACTTCTCTTCGACCGCCCGTCTCCGCCACTTCACTAGTG
D E K T Q Q Q L I D D H F L F D R P V S R H F T S
750 GTGGTATGGCCAGGGACTTTCCCGACGGTAGGGGTATCTGGCATAACGACAAGAAGAAATTCCTTGTATGGATCA
G G M A R D F P D G R G I W H N D K K N F L V W I
825 ACGAGGAGGATCACACTCGTATCATCTCGATGCAGATGGCGGCAACATGAAGGAGGCTTTGAGCGTTTATAGCC
N E E D H T R I I S M Q M G G N M K E V F E R F S
900 GTGGTCTTGCTCAGTTCGAAAACATATAAAAAGACAAGACTGGCAAGGAATTCATGAAGAAGCATCATCTTGGTT
R G L A Q V E K H I K D K T G K E F M K N D H L G
975 ACATTTGACGTGCCCATCAAACTCGGTACCGGGTACGATGCAGTGTTCATGCTAAGCTACCAAAATGGCGA
Y I L T [C P S N L G ] G V R C S V H A K L P N M A
1050 AGGACAAGAGATTCGAAGAGATCTGCACAAAGATGAGGTTGCAGAAGAGAGGAACAGCGGAGAGTTCACGGAGA
K D K R F E E I C T K M R L Q K R G T S G E F T E
1125 GTGTAGGAGCGCTATGATATCTCTAACCTGGACCGTCTGGGTAGCTCTGAGGTAGAGCAAGTCAATTCGGTCA
S V G G V Y D I S N L D R L G S S E V E Q V N C V
1200 TCAGGGGTGTCAAGACCCTCATCGAGATGGAGAAGAACTCGAAAAGGAAGAATCAATCGACGATCTCATTCTTA
I R G V K T L I E M E K K L E K E E S I D D L I P
1275 AGTAAAAGAGGAAGCCATAACTTAGTCAAGTCACTTGGTGCCTTCTGATTTATTCTACGAATAACTTTCATT
K .
1350 CTTGAGCGAATAAACACACCAGGAGAGTTGGTAATAGCTTGGGTTATGCGGGTGGGTGTCGTCATCGTTTTTGC
TGATAATGTCCTACTGGTGTACCTGGTGTAAACCAAACTATTACCAAGCTTCATAITATTGTACGAGGGTAT
1425 AAGAGAGACAAAATATTTATCTCAGGAAGGAATGCACCCAGAGTACTTGTTCATAAGCTTTTGGCCCTTT
1500 TTGACTATACGTAGAATTTATCTATATTTATGTTTATCTGTTCCATCTATCATGTGAATGTTGTGTTTGGCTTGA
1575 GTGATGCCATATATCGCAACGTCATATGACGTTATGAGCCAGTTAGGAGAAGGAGTGCATGTATAGTAGG
1650 TTAGATGAATGTGACTTTTGTATGCTGCAGATGACAGAGATATTGTTAGTTTGGAGGATTTGATGGATAAAATGTC
1725 CAGCTATGTTTCGTGTAGCTGTACCAAGTTTTCAATTCCTGTTCTGCCCCCTCAATTTTCTTGATTATAAA
1800 ATATATATTTAAGAAAAAAGAAACAAATGTAAGCAAATGGGCATAATTTTCCAACGTGCGGTGCATACAACAG
1875 GTACGCTTACCTTTAAATGGCCGACTGTTGAACATCATATGATGTGGAGTGCATGTAAGGGTCATTTGACGT
1950 TCATCCGTAACAGATACGATTCGAAGCGTTTCATATGTTATAATGTCCTACTGTACATTAGAATCGTGGACA
2025 CTAGTTATTAATAAACAGTTTCTCTCTCTCACAGAAGGAAATAACCACCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
2100 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2139

```

图 1 白肛海地瓜精氨酸激酶 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of arginine kinase of *A. leucoprocta* “ ” 为酶的活性中心部位氨基酸序列; “ \_ ” 为多聚腺苷酸加尾信号; “ . ” 为终止密码子

抗体。Western blot 分析(图 4)显示诱导表达的菌体和白肛海地瓜组织样品, 在相对分子质量 44.3kDa 附近均可见单一的条带, 而阴性对照和未诱导的样品则没有条带出现。重组蛋白样品的条带比组织样品的条带要略微大一些, 这是因为重组蛋白含有载体多克

隆位点上游序列编码的一段氨基酸序列。免疫印迹结果证明制备多克隆抗体成功。

### 3 讨论

精氨酸激酶在无脊椎动物体内分布广泛, 并且在整个生命周期都存在, 它通过催化磷酸精氨酸与精氨酸之间的相互转变, 来调控机体内 ATP 的动态平衡。白肛海地瓜的精氨酸激酶的磷酸源激酶活性位点由 7 个氨基酸(CPSNLGT)组成, 该序列与其它物种已报道的精氨酸激酶活性位点高度保守, 与脊椎动物的肌酸激酶也非常相似。王政等(2005)对海参精氨酸激酶的活性位点进行了研究, 发现 Cys274、Arg283 和 His287 的突变体在二级结构上与野生型的精氨酸激酶没有区别, 但其活性却丧失, 特别是 Cys274, 因此认为该三个氨基酸残对海参精氨酸激酶结构或功能的保持有着重要作用, Cys274 残基可能是海参精氨酸激酶的活性位点。此外, 海参精氨酸激酶的 N-末端序列缺失, 会明显影响精氨酸激酶的结构稳定性和活性(Liu *et al*, 2008)。

精氨酸激酶属于磷酸原激酶家族中重要的成员, 其广泛存在于无脊椎动物体内。在精氨酸激酶的遗传进化过程中, 至少存在三个独立的进化过程: 第一次为磷酸原激酶进化的早期, 也就是典型的精氨酸激酶; 而后是后生动物的肌酸激酶进化(包括刺参属的精氨酸激酶)和第三次在环节动物线粒体肌酸激酶的进化。目前, 有研究显示, 精氨酸激酶在多齿新米虾中还存在着第四种进化过程(Iwanami *et al*, 2009)。精氨酸激酶在大多数的无脊椎动物中以单体的形式存在; 在海参和一些深海软体动物中存在双亚基精氨酸激酶、而在环节动物中, 则存在四亚基精氨酸激酶(Robin *et al*, 1975)。另外, 在原生动物、刺胞动物、扁形动物和异齿蛤中

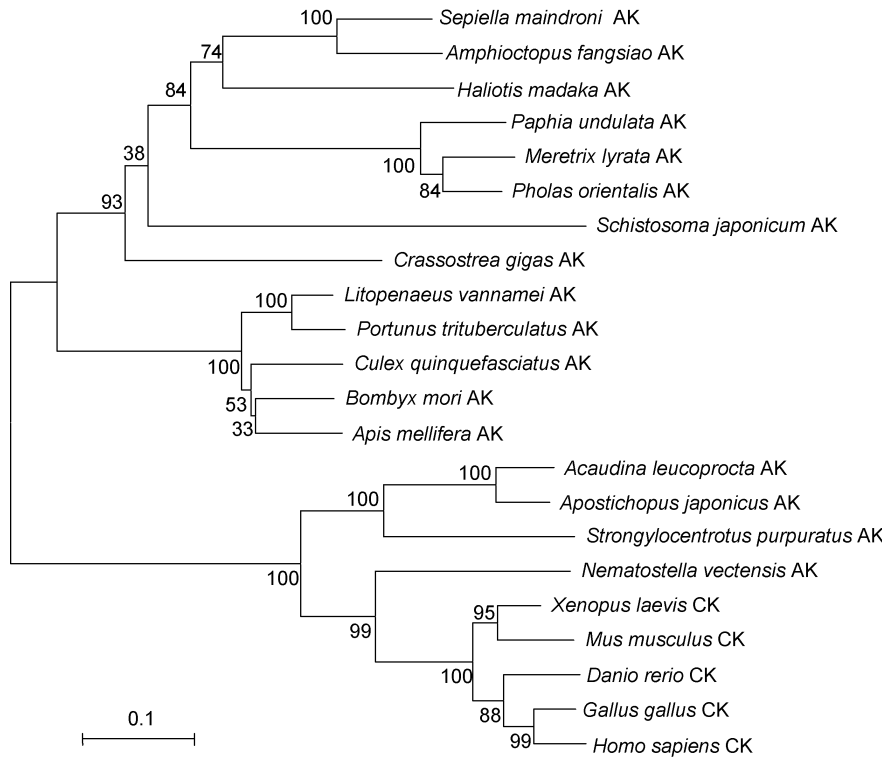


图 2 白肛海地瓜精氨酸激酶氨基酸序列构建系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed with the amino acid sequence of *A. leucoprocta* arginine kinase

还存在着分子量为 80kDa 的精氨酸激酶, 这些具有双结构域的精氨酸激酶被认为是源于基因重复和融合产生的(Suzuki *et al.*, 1997; Uda *et al.*, 2008)。从图 2 中可以看到, 白肛海地瓜精氨酸激酶的氨基酸序列与已报道的刺参、海胆等棘皮动物的精氨酸激酶氨基酸序列相似度高, 而且与脊椎动物肌酸激酶聚为一支, 与其它无脊椎动物的精氨酸激酶的遗传距相对较远。

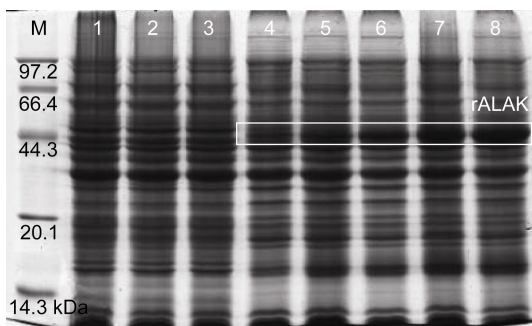


图 3 白肛海地瓜精氨酸激酶重组表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.3 Analysis of SDS-PAGE of recombinant arginine kinase of *A. leucoprocta*

M: 蛋白质分子量标准; 1: pET-28a(+)未诱导; 2: pET-28a(+)诱导 5h; 3: pET-AK 诱导 0h; 4: pET-AK 诱导 1h; 5: pET-AK 诱导 2h; 6: pET-AK 诱导 3h; 7: pET-AK 诱导 4h; 8: pET-AK 诱导 5h

精氨酸激酶不仅在无脊椎动物的能量代谢中扮演了重要的角色, 在无脊椎动物适应不同环境变化和免疫反应的过程中, 精氨酸激酶也发挥了重要作用(姚翠鸾等, 2008)。在盐度(Kotlyar *et al.*, 2000)、重金属(Silvestre *et al.*, 2006)、病毒(Astrosfsky *et al.*, 2002)等各种环境条件刺激下, 精氨酸激酶均有不同的变化, 这说明精氨酸激酶在无脊椎动物适应环境、机体免疫等起着重要作用。但是, 精氨酸激酶的作用机理缺乏系统研究, 本实验室已经制备获得白肛海地瓜精氨酸激酶的多克隆抗体, 为深入研究其定位和蛋白质相互作用提供了基础。

近年来, 随着人们对海参认识的不断深入, 白肛海地瓜资源开发的不断扩大, 对白肛海地瓜的基础研究特别是分子生物学研究的相对滞后, 会影响其资源的合理开发利用。应用现代分子生物学技术, 对白肛海地瓜功能基因展开研究是十分必要的, 这有助于更好地了解白肛海地瓜的生活习性、生理代谢及机体防御等各项生命活动。精氨酸激酶是白肛海地瓜体内最重要能量代谢酶之一, 对其的研究具有重要的理论和应用价值。白肛海地瓜精氨酸激酶基因的克隆,

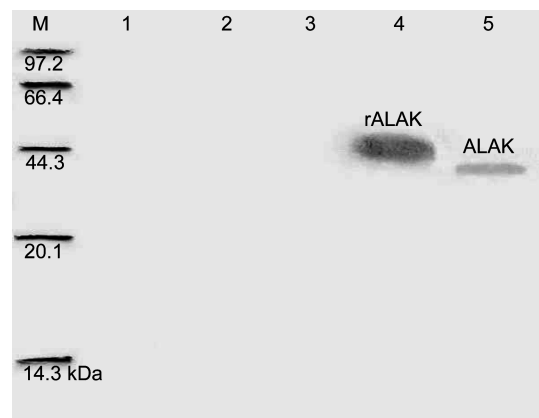


图 4 白肛海地瓜精氨酸激酶多克隆抗体的 Western blot 结果

Fig.4 Specificity of arginine kinase polyclonal antibody was determined using Western blot

M: 蛋白质分子量标准; 1: pET-28a(+)诱导 5h; 2: pET-AK 未诱导; 3: 阴性对照; 4: pET-AK 诱导 5h; 5: 白肛海地瓜总蛋白

能够为海参精氨酸激酶在其机体能量代谢和免疫应答等方面的研究提供帮助, 也能为今后对白肛海地瓜产业的发展积累基础资料。

### 参 考 文 献

- 王 政, 郭淑元, 张建伟等, 2005. 用点突变方法研究海参精氨酸激酶的活性位点. 清华大学学报(自然科学版), 45(6): 858—861
- 侯付景, 金春华, 董明敏等, 2010. 响应面分析法优化海地瓜酶解工艺及其抗氧化活性的研究. 营养学报, 34(3): 276—280
- 姚翠鸾, 王志勇, 相建海, 2008. 甲壳动物精氨酸激酶的结构与功能. 中国生物化学与分子生物学报, 24(3): 203—208
- 徐彩云, 苏秀榕, 李妍妍等, 2009. 海地瓜的营养成分及其降血脂功能. 营养学报, 31(4): 384—387
- 管越强, 王慧春, 李 利, 2009. 硫化物胁迫对日本沼虾呼吸代谢和能量代谢酶的影响. 生态环境学报, 18(6): 2017—2012
- Astrofsky K M, Roux M M, Klimpel K R *et al*, 2002. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). Arch Virol, 147(9): 1799—1812
- Ellington W R, 1989. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens. J Exp Biol, 143: 177—194
- Iwanami K, Iseno S, Uda K *et al*, 2009. A novel arginine kinase from the shrimp *Neocaridina denticulata*: The fourth arginine kinase gene lineage. Gene, 437: 80—87
- Kotlyar S, Weihrauch D, Paulsen R S *et al*, 2000. Expression of arginine kinase enzymatic activity and mRNA in gills of the euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. J Exp Biol, 203(16): 2395—2404
- Liu T T, Wang X C, 2008. Effects of N-terminal deletion mutation on arginine kinase from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. Int J Biol Macromol, 42(1): 68—74
- Robin Y, Guillou A, Van Thoai N, 1975. Unspecific arginine kinase of molecular weight 150000. amino acid composition, subunit structure and number of substrate binding sites. Eur J Biochem, 52(3): 531—537
- Silvestre F, Dierick J F, Dumont V *et al*, 2006. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium. Aquatic Toxicol, 76(1): 46—58
- Su X R, Du L L, Li Y Y *et al*, 2009. Production of recombinant protein and polyclonal mouse antiserum for ferritin from *Sipuncula Phascolosoma esculenta*. Fish Shellfish Immun, 27: 466—468
- Suzuki T, Kawasaki Y, Furukohri T, 1997. Evolution of phosphagen kinase. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. Biochem J, 328: 301—306
- Uda K, Yamamoto K, Iwasaki N *et al*, 2008. Two-domain arginine kinase from the deep-sea clam *Calymene kaikoi*—evidence of two active domains. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 151: 176—182

## CLONING AND OVEREXPRESSION OF *ACAUDINA LEUCOPROCTA* ARGININE KINASE

ZHOU Jun<sup>1</sup>, LI Cheng-Hua<sup>1</sup>, LI Ye<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, JIN Chun-Hua<sup>1</sup>, XIA Chang-Ge<sup>1</sup>,  
LI Tai-Wu<sup>1,2</sup>, SU Xiu-Rong<sup>1</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

**Abstract** Arginine kinase is a phosphotransferase that plays a critical role in maintaining equilibrium of invertebrate energy metabolism. We isolated the gene encoding arginine kinase from *Acaudina leucoprocta*. The full-length of cDNA is 2139bp long, including 92bp of 5' untranslated region (5'-UTR) sequence, 934bp of 3' untranslated region (3'-UTR) sequence and 1113bp of open reading frame. It encodes 319 amino acids, the predicted molecular mass and isoelectric point are 42.32kDa and 7.19, respectively. The resulting product was then cloned into the expression vector and induced with IPTG. The overexpressed protein was with the expected size. Polyclonal antibody was prepared and the specificity of the antibody was confirmed by Western blot analysis.

**Key words** *Acaudina leucoprocta*, Arginine kinase, Prokaryotic expression, Polyclonal antibody