

南移养殖刺参(*Apostichopus japonicus*) 原肌球蛋白基因的原核表达研究*

夏长革^{1,3} 崔静¹ 王中华¹ 李成华¹ 周君¹
李晔¹ 张春丹¹ 李太武² 苏秀榕¹

(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;
3. 长春市新立城水库管理局 长春 130119)

摘要 本研究克隆和表达了刺参原肌球蛋白(Tropomyosin, TRP)基因, 进一步研究刺参再生过程中重要分子的功能。结果表明, TRP 基因序列总长为 1203bp, 5'非翻译区为 105bp, 3'非翻译区为 240bp, 该序列包含一个 855bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码 284 个氨基酸, 分子量为 33.27kDa, 等电点为 4.56。利用 *Escherichia coli* 对 TRP 进行了体外重组表达, 在 1mmol/L IPTG 和 37°C 条件下诱导, 能产生分子质量约为 38kDa 的重组蛋白, Western blot 证明重组 TRP 与鼠抗刺参原肌球蛋白的多克隆抗体能特异性结合。

关键词 刺参, 原肌球蛋白, 克隆与表达, 蛋白质印迹法
中图分类号 Q346

刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka), 又称仿刺参, 属棘皮动物门(Echinodermata)、游走亚门(Eleutherozoa)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirota)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*), 是典型的温带或亚热带种类(廖玉麟, 1997), 主要分布在北太平洋沿岸浅海。目前, 国内外对刺参的研究主要集中在营养价值(赵芹等, 2008)、再生(郑法新等, 2006; 檀永凯等, 2008)、养殖(肖树旭等, 1981; 李元山等, 1994; 石晓辉等, 2009)和免疫(Bulgakov *et al.*, 1999)等方面。再生作为刺参重要的生命过程, 越来越多地受到人们关注。然而, 目前刺参再生的研究多局限于再生的外部形态、组织结构和细胞功能等方面(聂竹兰等, 2006), 涉及再生机制或者相关功能基因的研究较少。通过构建再生肠组织的cDNA文库, 可发现多个与刺参再生有关的重要分子和酶类, 其中胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶参与了刺参再生的调控(崔静等, 2010); 通过 DDRT 识别了与

CD151 同源片段, 并初步证实其参与表皮再生(陈秋实等, 2008)。原肌球蛋白(tropomyosin, TRP)作为肌肉收缩过程中重要的调节蛋白质, 是真核细胞细肌丝中不可缺少的组成成分(Moraczewska, 2002), 它具有二聚化的 α -螺旋结构(Marston *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006), 在肌肉收缩中起重要调节作用。考虑到再生过程与肌肉的再生长和运动息息相关, 作者推测 TRP 也可能参与刺参的再生过程。为此, 本研究在前期获得的全长cDNA的基础上, 搭建了该基因的体外表达系统, 获得了大量的体外重组蛋白, 并进一步制备了该蛋白的多克隆抗体, 为下一步的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

南移养殖的刺参取自浙江宁波奉化碧博水产养殖公司, 体重(120±20)g。四周龄 BALB/c 小鼠购于浙

* 国家农业科技成果转化资金, 2007GB2C220359 号; 浙江省重大科技专项(优先主题)重大农业项目, 2008C02009- -2 号; 宁波市农业科技成果转化资金, 2007C30001 号。夏长革, 博士研究生, E-mail: xcg19670214@126.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: 2012-02-16, 收修改稿日期: 2012-04-14

江省实验动物中心。RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂、pMD18-T 质粒、*Taq* DNA Polymerase、DNA Marker、荧光染料 SYBR Premix Ex *Taq*TM II 均为 TaKaRa 产品, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司。表达宿主菌 *E. coli* BL21、表达质粒 pET-28a(+)由本实验室保存。兔抗鼠 IgG, 弗氏佐剂购自 Sigma 公司, 其余均为国产分析纯试剂, 购于宁波奥博化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 原肌球蛋白表达载体的构建 根据本课题组已克隆到的 TRP 的全长序列(HM802256)设计基因特异性引物 TrpF(5'-CGGGATCCATGGATACCATCAAGAAG-3')和 TrpR(5'-CCCAAGCTTTCACACCTCGAAGTTCAA-3')(下划线为添加的限制性内切酶 *Bam*H 和 *Hind* 的识别序列), 扩增刺参的 TRP 基因的 ORF 序列。PCR 反应条件如下: 预变性 94℃ 5min, 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 1min, 运行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物经 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒纯化目的产物。纯化产物用 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切后插入到同样双酶切的原核表达载体 pET-28a(+) 中, 获得重组质粒 pET-TRP。

1.2.2 原核表达 pET-TRP 转化感受态的 *E. coli* BL21 菌株, 经 PCR 筛选和酶切鉴定后的阳性重组克隆用于表达分析。将鉴定的阳性重组细菌接种到 LB 培养液(含 50μg/ml 卡那霉素), 37℃ 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.5 时加入 IPTG 使其终浓度为 1mmol/L, 37℃ 诱导表达。在加入诱导剂后 0、1、2、3、4、5、6h 收集菌液 1ml 经 12000r/min 离心 5min, 弃上清液, 于 -20℃ 保存备用。样品用 40μl pH 7.4 的 PBS 悬浮细菌沉淀物, 加入 10μl 的 5× 样品缓冲液, 水浴煮沸 10min 后立即置于冰上, 通过 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 首先用 3mol/L KCl 溶液洗涤 SDS-PAGE 凝胶, 切胶回收目的表达产物, 转移至 PBS 中捣碎, 与弗氏佐剂等量混合后, 腹腔注射 5 只雄性的四周龄的 BALB/c 小鼠。首次免疫抗原用量为 100μg/只, 二次免疫抗原用量为 75μg/只, 三次免疫抗原用量为 50μg/只, 加强免疫抗原用量为 75μg/只, 三次免疫各间隔一周, 三次免疫与加强免疫之间间隔 3d。小鼠加强免疫 3d 后摘眼球取血, 收集血液于 37℃ 静置 30min 后, 再在 4℃ 下静置过夜。室温 1600r/min 离心 10min, 吸取上层的多抗血清, 分

装于 -80℃ 保存备用。

1.2.4 Western blot 检测 取刺参肌肉组织和含有阳性重组子的 *E. coli* BL21 诱导菌体, 进行总蛋白提取。将组织在液氮预冷的研钵中充分研磨, 按质量比 1 : 5 的比例用 PBS 重悬, 在冰上超声破碎后 12000r/min 离心 15min, 取上清。加入 5× 样品缓冲液, 沸水煮 10min, SDS-PAGE 电泳分析, 待溴酚兰跑到底部停止电泳。将凝胶中的蛋白样品在 20V、4℃ 条件下过夜转移至同样大小的 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶(溶于 TBST 中)封闭 4h, 以 1 : 5000 的比例加入抗刺参原肌球蛋白的多克隆抗体。多克隆抗体先用 *E. coli* BL21 菌体吸附 4—8h, 与膜杂交反应 2h, 用 TBST 漂洗膜 3 次, 每次 10min, 最后再用 TBS 漂洗 10min; 再加二抗杂交 1h, 经 TBST 漂洗和 TBS 漂洗后, 用 NBT/BCIP 显色。

2 结果

2.1 原肌球蛋白基因全长序列

利用带有限制性内切酶切位点和保护碱基的正反向引物, 扩增出了大小约为 850bp 的单一一条带, 与作者前期(崔静等, 2010)获得原肌球蛋白全长吻合(图 1)。测序结果验证该片段为刺参原肌球蛋白 ORF 片段。

2.2 原肌球蛋白体外表达

SDS-PAGE 电泳检测 IPTG 诱导的阳性转化株和阴性对照菌株重组原肌球蛋白的表达情况, 结果如图 2。IPTG 诱导后, 在 38kDa 处可见的表达产物, 该

位置与预测的刺参原肌球蛋白体外重组产物分子量一致, 而未经诱导菌株与空载体阴性对照菌在此位置确实缺少该条带, 表明目的蛋白在大肠杆菌中得到了表达。

2.3 Western blot 检测

利用 2.2 的表达产物, 制备多克隆抗体, 进行 Western blot 分析, 结果见图 3。制备的多克隆抗体可以在 38kDa 位置处特异性识别刺参原肌球蛋白的体外重组产物。*E. coli* BL21 菌体自身蛋白与多抗没有特异性结合, 不发生抗原抗体反应, 且免疫前血清与

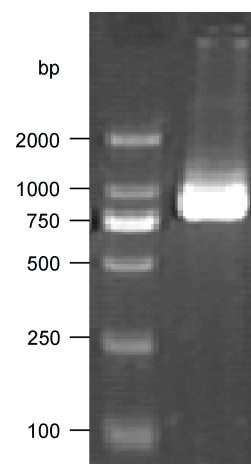


图 1 刺参 TRP 的 ORF 电泳图谱

Fig.1 The electrophoretic pattern of tropomyosin ORF of *A. japonicus*

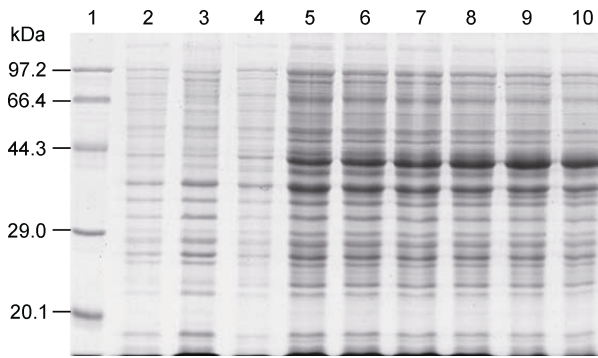


图2 刺参原肌球蛋白体外重组表达的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 2 The SDS-PAGE pattern of recombinant tropomyosin of *A. japonicus*

1. 蛋白质分子量标准; 2. pET-28a 不诱导; 3. pET-28a 诱导 4h;
4. pET-TRP 不诱导; 5—10. pET-TRP 诱导 1—4h

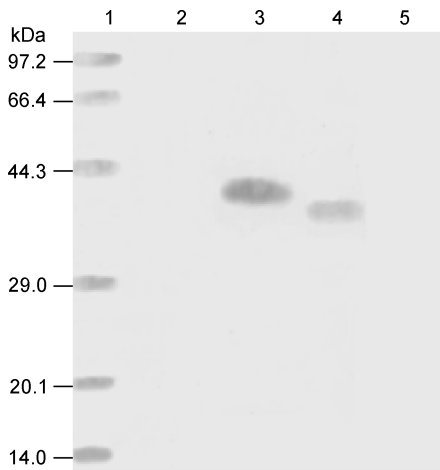


图3 Western blot 检测刺参原肌球蛋白多抗的特异性
Fig.3 Specificity of pET-TRP polyclonal antibody of *A. japonicus* by Western blot

1. 蛋白质分子量标准; 2. pET-28a 诱导 4h; 3. pET-TRP 诱导 4h; 4. 刺参总蛋白; 5. 空白对照

PBS 对照组分别呈阴性反应, 证实本实验获得的多抗是成功的。利用此抗体, 在刺参总蛋白提取物中特异性识别了一条略小于重组蛋白的的条带, 能与多抗特异性结合, 且与刺参原肌球蛋白的分子量相符。

3 讨论

以海参为代表的生物体受到损伤后, 某些残存组织可一定程度上再生, 这种再生修复的优点是新生组织是自体的, 可形成与原来组织形态结构以及功能相同的组织器官。深入研究再生的内在机制, 可为解答器官、组织发生过程提供理论支撑, 更为重要的是可以为人们定向地生产移植器官、解除病人痛苦提供帮助。虽然国内外早在 19 世纪就开始刺参再生

的研究, 但研究的方向相对分散, 研究涉及的器官主要包括肠、体壁和居维尔氏小管等(Vandenspiegel *et al.*, 2000; Shukalyuk *et al.*, 2001), 还基本未触及刺参再生的内在调控机制。

原肌球蛋白作为存在于平滑肌、骨骼肌和心肌中的重要蛋白质, 由 α 和 β 两种亚基组成, 与肌动蛋白形成肌钙蛋白复合体, 进而影响肌肉收缩。同时发现, 该蛋白参与了细胞生长和分裂的调控过程。MacDonald 等(2001)对原肌球蛋白在血管生成抑制因子的抗肿瘤效应中的作用进行了研究。结果显示与血管生成抑制因子结合的原肌球蛋白和肌动蛋白一起位于固定的内皮细胞的微丝上, 原肌球蛋白使肌动蛋白稳定于聚合状态, 因此直接影响微丝的整合性。由此提示, 原肌球蛋白在调节细胞能动性、细胞浆移动、形态学发生和诱导内皮细胞凋亡等方面都具有重要作用。为此, 作者推断该蛋白可能是刺参再生过程中的重要分子。为探讨原肌球蛋白在刺参的再生过程中的作用途径和方式, 本研究成功获得该蛋白的体外表达产物, 制备了特异性较好的该蛋白抗血清, 为以后进一步研究原肌球蛋白在刺参生长发育中和再生中的表达情况和功能途径提供了基础。

参 考 文 献

- 石晓辉, 李太武, 陈 燕等, 2009. 发病仿刺参细菌的分离鉴定和生长特性的研究. 水产科学, 28(8): 435—438
李元山, 王远隆, 王培良, 1994. 刺参的生活环境及增养殖水域选择. 海洋湖沼通报, (4): 42—46
肖树旭, 顾功超, 1981. 刺参南移与人工育苗试验. 水产学报, 6(2): 147—153
陈秋实, 李 霞, 段晶晶等, 2008. 利用差异显示法研究刺参表皮再生相关基因. 生物技术通报, 6: 124—131
郑法新, 孙修勤, 张进行, 2006. 刺参吐脏再生的组织学研究. 中国水产科学, 13(1): 134—139
赵 芹, 王静凤, 薛 勇等, 2008. 3 种海参的主要活性成分和免疫调节作用的比较研究. 中国水产科学, 15(1): 154—159
聂竹兰, 李 霞, 2006. 海参再生的研究. 海洋科学, 30(5): 78—82
崔 静, 李太武, 苏秀榕等, 2010. 南移养殖的刺参(*Apostichopus japonicus*)cDNA 文库的构建及原肌球蛋白基因的研究. 海洋与湖沼, 41(6): 850—856
廖玉麟, 1997. 中国动物志(第 1 卷). 北京: 科学出版社, 1—142
檀永凯, 李 霞, 段晶晶等, 2008. 仿刺参内脏再生过程的能量代谢及生化组成变化. 中国水产科学, 15(4): 683—688
Bulgakov A, Petroval Y, Eliseikina M B *et al.*, 1999. Properties of mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the sea

- cucumber *Stichopus japonicus*. Biol Morya, 25(2): 91—93
- Chen W Z, Wen K K, Ashleg E *et al*, 2006. Differential interaction of cardiac, skeletal muscle, and yeast tropomyosins with fluorescent (Pyrene235) yeast actin. Biophys J, 90: 1308—1318
- MacDonald N, Shivers W, Narum D *et al*, 2001. The role of tropomyosin and the cytoskeleton in the antitumor activity of Endostatin. Clin Cancer Res, 12(7): 11
- Marston S B, Redwood C S, 2003. Modulation of thin filament activation by breakdown or isoform switching of thin filament proteins: physiological and pathological implications. Circ Res, 93: 1170—1178
- Moraczewska J, 2002. Structural determinants of cooperativity in actomyosin interaction. Acta Biochimica Polonica, 49(4): 805—812
- Shukalyuk A I, Dolmatov I Y, 2001. Regeneration of the digestive tube in the holothurian *Apostichopus japonicus* after evisceration. Russ J Mar Biol, 27(3): 168—173
- Vandenspiegel D, Jangoux M, Flammang P, 2000. Maintaining the line of defense: Regeneration of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). Biol Bull, 198(1): 34—49

PROKARYOTIC EXPRESSION OF TROPOMYOSIN GENE FROM SOUTH CULTURED SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

XIA Chang-Ge^{1,3}, CUI Jing¹, WANG Zhong-Hua¹, LI Cheng-Hua¹, ZHOU Jun¹,
LI Ye¹, ZHANG Chun-Dan¹, LI Tai-Wu², SU Xiu-Rong¹

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100; 3. Xinlicheng Reservoir Management Bureau in Changchun, Changchun, 130119)

Abstract Regeneration is a vital physiological process in *Apostichopus japonicus*, and was considered to a good model for organ and tissues culture *in vitro*. In order to further understand the function of some key molecules in this process, the tropomyosin gene of *A. japonicus* was cloned and expressed. The full-length of tropomyosin gene was 1203bp including a 105bp of 5' untranslated region (UTR), a 240bp of 3' UTR and a 855bp of open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 284 amino acids. The estimated molecular mass of tropomyosin gene is 33.27kDa, and the theoretical isoelectric point is 4.56. The recombinant pET-Trp protein was successfully expressed in *E. coli*. The recombinant protein pET-Trp had clearly visible band in 38kDa. The polyclonal antibody could specifically bind to the recombinant TRP by Western blot.

Key words *Apostichopus japonicus*, Tropomyosin, Cloning and expression, Western blot