

三疣梭子蟹 *PtCrustin3* 成熟肽在毕赤酵母中的重组 DNA 表达

卢希阳,陶妍*

上海海洋大学 食品学院,上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,上海 201306

摘要: Crustin 抗菌肽是一类由甲壳动物表达的具有抗菌作用的小分子肽,它们在动物抵御病原微生物感染的免疫系统中发挥了重要作用,被认为是替代抗生素的良好候选者。Crustin 的 N 端含有一个信号序列,与之相连接的 C 端为成熟肽序列,内含一个 WAP (Whey acidic protein) 结构域,为 Crustin 的活性区域;根据信号肽与 WAP 结构域之间的结构差异,可以将 Crustin 分为三种类型。本文以三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) I 型 Crustin 的一个同工型“*PtCrustin3*”的成熟肽 (*mPtCrustin3*) 为研究对象,通过 RT-PCR 从鳃中克隆到编码 *mPtCrustin3* 的 cDNA,并通过巢式 PCR 对其添加 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切位点以及 6×His 标签。以 pPICZαA 为真核表达载体,成功构建了重组表达载体 pPICZαA-*mPtCrustin3*,电转入毕赤酵母 X-33,在 29 °C、250 r/m 的条件下,经 1.0% 甲醇诱导表达 96 h 后,获得的表达产物经 Tricine-SDS-PAGE 分析,证明分子量约为 11.6 kD 的重组体 *mPtCrustin3* 在毕赤酵母 X-33 中被成功表达。

关键词: 三疣梭子蟹; RT-PCR; *PtCrustin3* 成熟肽; 毕赤酵母; 重组表达

中图分类号: TQ465.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2017)02-0303-07

Recombinant DNA Expression of *PtCrustin3* Mature Peptide from *Portunus trituberculatus* in *Pichia pastoris*

LU Xi-yang, TAO Yan*

Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation/College of Food Science and Technology/Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Crustins are series of small molecular antimicrobial peptides expressed mainly in crustaceans. They play important roles in the animal immune system against pathogenic microorganism infection, thus, they are considered to be good candidates to replace antibiotics. The N-terminal of Crustin contains a signal sequence and its C-terminal contains a mature peptide sequence including the WAP (whey acidic protein) domain. The mature peptide is responsible for bioactivity of Crustin. According to structural differences of the region between signal peptide and WAP domain, Crustin can be divided into three types. The present study focused on the *mPtCrustin3*, the mature peptide of an isoform for Crustin type I from *Portunus trituberculatus*. The cDNA encoding *mPtCrustin3* was cloned from gill of *P. trituberculatus* by RT-PCR. *EcoRI* site, and *XbaI* site and 6×His tag were added to 5' and 3' of this cDNA, respectively, by nested PCR. This target fragment was ligated to pPICZ α A vector to construct a recombinant expression vector pPICZ α A-*mPtCrustin3*. Then the pPICZαA-*mPtCrustin3* was transformed into competent *Pichia pastoris* X-33 cells. Recombinant *mPtCrustin3* was induced with 1.0% (V/V) methanol at 29 °C, 250 r/m for 96 h. Tricine-SDS-PAGE analysis demonstrated that the expressed product was the recombinant *mPtCrustin3* with molecular weight of about 11.6 kD.

Keywords: *Portunus trituberculatus*; RT-PCR; *Ptcrustin3* mature peptide; *Pichia pastoris*; recombinant expression

Relf等^[1]首次从普通滨蟹(*Carcinus maenas*)血细胞中分离到Crustin抗菌肽,其分子量为11.5 kD、富含脯氨酸和半胱氨酸。Crustin的N端含有一个信号序列,与之相连接的C端为成熟肽序列,内含一个WAP(Whey acidic protein)结构域,该结构域包含8个保守的半胱氨酸残基,形成一个含有4个二硫键的紧密包裹结构,是Crustin的主要功能域^[2]。Smith等^[3]根据Crustin信号肽与WAP结构域之间的结构差异,将Crustin分为三种类型。I型Crustin:主要存在于蟹类、螯虾和龙虾等甲壳动物中,在信号肽与WAP结构域之间存在一个序列长度多变、富含半胱氨酸残基的结构域;II型Crustin:主要存在于对虾中,在信号肽与WAP结构域之间不仅富含半胱氨酸,还富含甘氨酸;III型Crustin:在信号肽与WAP结构域之间既没有半胱氨酸残基也没有甘氨酸残基,故被称为SWD(Single-whey domain)蛋白,亦或Antileukoproteinase-like蛋白或者Chelonianin-like蛋白。抑菌实验表明,Crustins除了对微球菌属、气球菌属、动性球菌属、葡萄球菌属、链球菌属、棒状杆菌属

收稿日期: 2016-06-01

修回日期: 2016-07-12

基金项目: 上海市教育委员会产学研项目(15CX30);农业部都市农业(南方)重点实验室开放基金(UA201307)

作者简介: 卢希阳(1989-),男,硕士研究生,研究方向:水产生物分子生物学。E-mail:125119453@qq.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:ytiao@shou.edu.cn

和芽孢杆菌属等革兰氏阳性菌有抑菌活性外^[1,4-6]，还对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 等革兰氏阴性菌有不同程度的抑菌活性^[7]。

2013 年, Cui 等^[7]从三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的鳃和眼柄中分离到编码 I 型 Crustin 的三种同工型基因 (*PtCrustin1*、*PtCrustin2*、*PtCrustin3*)，并对其中的 *PtCrustin3* 成熟肽基因进行了大肠杆菌原核表达，获得的重组体 *PtCrustin3* 成熟肽显示了一定的抑菌作用。然而，原核表达系统存在无翻译后折叠修饰功能、易在细胞内形成包涵体等众所周知的缺点^[8]，且不适合大规模制备。相比之下，毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统能高效表达外源蛋白、表达稳定性高，并具有翻译后修饰功能，有利于获得具生物学活性的重组蛋白，并适合扩大制备^[9]。据此，本研究以三疣梭子蟹 I 型 Crustin 的 *PtCrustin3* 成熟肽 (*mPtCrustin3*) 为研究对象，旨在初步建立基于毕赤酵母表达系统的 *mPtCrustin3* 的重组 DNA 表达方法，为进一步扩大制备和对其生物学功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

三疣梭子蟹 (400 g) 购自上海芦潮港海鲜市场。毕赤酵母 X-33 菌株及表达载体 pPICZαA 为 Invitrogen 公司 (美国) 产品；大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存；限制性内切酶 *EcoRI*、*XbaI*、*SacI* 和 T4 DNA 连接酶以及克隆质粒 pMD-19T simple 购自 TaKaRa 公司 (日本)。胰蛋白胨、酵母粉为 OXOID 公司 (英国) 产品。博来霉素为 Invitrogen 公司 (美国) 产品；DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、酵母 DNA 提取试剂盒、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准和 PCR 反应试剂均购自天根生化科技有限公司 (北京)。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

三疣梭子蟹运至实验室后，取其眼柄和鳃快速置于液氮中冻结，按照 RNAiso Plus 说明书提取总 RNA。第一链 cDNA 的合成按照 Prime Script 试剂盒 (TaKaRa) 操作：总 RNA 6 μL、Oligo (dT) Primer (50 μmol/L) 1 μL、dNTP Mixture (10 mmol/L each) 1 μL、ddH₂O 2 μL 混匀，65 °C 保温 5 min，冰上迅速冷却；依次加入 5×Buffer 4 μL、RNase inhibitor (40 U/μL) 0.5 μL、Prime Script RTase (200U) 1 μL (200 U)、RNase Free dH₂O 4.5 μL，缓慢混匀后 42 °C 保温 30~60 min；95 °C 保温 5 min，冰上冷却后得到第一链 cDNA。

1.3 含限制性酶切位点的 *mPtCrustin3* 基因的 PCR 扩增

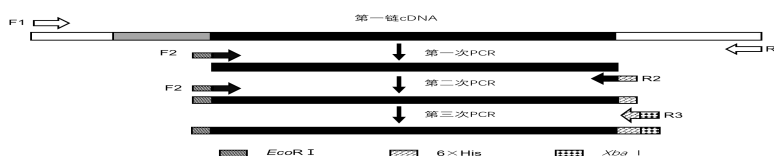


图 1 通过 PCR 扩增目的基因的策略图

Fig.1 Strategic map for PCR amplification of target gene

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'-3')	大小 Size (bp)
F1	TCTCAAGTTGCCTCGCTCT	19
R1	ATTC AAGGGCAATCATAGTGAC	22
F2	<u>GAATTC</u> GGGACGCCTCCTATATC	23
R2	ATGATGATGATGATGATGTGGGTCAGCAATCAGG	34
R3	<u>TCTAGACTAATGATGATGATGATGATGTGG</u>	30
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21

下划线为 *EcoRI* 和 *XbaI* 的酶切位点。EcoRI and XbaI sites are underlined.

PCR 策略如图 1 所示，参考 *PtCrustin3* 的 cDNA 序列 (GenBank 注册号: JQ728424) 设计一对特异性引物 F1 和 R1 (表 1)，以第一链 cDNA 为模板进行第一次 PCR，反应体系和条件为：上下

游引物(10 mol/L)各 0.8 L、10×Buffer 2.0 L、dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 L、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/L) 0.2 L、DNA 模板 0.5 L, 加无菌水至 20 L; 94 °C 预变性 3 min、94 °C 变性 30 s、退火 (56.5 °C) 30 s、72 °C 延伸 1 min, 最终 72 °C 延伸 5 min, 30 个循环。以第一次 PCR 产物为模板, 设计含 *EcoRI* 酶切位点的前引物 F2 和含 6×His 标签的后引物 R2 (表 1) 进行第二次 PCR, 反应体系和条件同第一次 PCR, 除了退火温度改为 56 °C; 再以第二次 PCR 产物为模板, 设计含 *XbaI* 酶切位点的后引物 R3 (表 1), 采用 F2 与 R3 进行第三次 PCR, 反应体系和条件同第一次 PCR, 除了退火温度改为 57.9 °C。第三次 PCR 产物经割胶纯化后与 pMD-19T 质粒连接得到重组质粒 pMD-19T-*mPtCrustin3*, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 °C 培养过夜, 挑 1 个阳性克隆由上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 Crustin 氨基酸序列的多重比对及分子系统树的构建

使用 DNAMAN6.0 对 Crustin 全长氨基酸序列进行多重比对, 各序列来自 NCBI 网站, 序列号分别为: *PtCrustin3* (GenBank 登录号: AFU61580.1)、美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*, GenBank 登录号: ABM92333.1)、眼斑龙虾 (*Panulirus argus*, GenBank 登录号: AAQ15293.1)、欧洲龙虾 (*Homarus gammarus*, GenBank 登录号: CAH10349.1)、远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus1*, GenBank 登录号: ABM65762.1; *Portunus pelagicus2*, GenBank 登录号: AFN37210.1)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*, GenBank 登录号: ACL15396.1)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicas*, GenBank 登录号: AME17866.1)、紫螯青蟹 (*Scylla tranquebarica1*, GenBank 登录号: AGU01540.1; *Scylla tranquebarica2*, GenBank 登录号: AFI56572.1)、挪威海螯虾 (*Nephrops norvegicus*, GenBank 登录号: CCE46014.1)、日本仿长额虾 (*Pandalopsis japonica1*, GenBank 登录号: AFN80342.1; *Pandalopsis japonica2*, GenBank 登录号: AGU01543.1)。分子系统树根据上述生物 Crustin 全长的氨基酸序列构建, 采用 MEGA6.0 邻位相联法, 各结点的置信度由自引导值估计, 重复次数为 1000。

1.5 重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3* 的构建及电转化毕赤酵母 X-33

采用 *EcoRI* 和 *XbaI* 对测序无误的 pMD-19T-*mPtCrustin3* 进行双酶切, 将获得的片段 *mPtCrustin3* 与经相同酶处理过的表达载体 pPICZ α A 混合, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 16 °C 反应过夜; 转化感受态细胞 DH5 α 后, 37 °C 培养过夜; 通过菌落 PCR、双酶切和 DNA 测序鉴定重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3*。采用 *SacI* 对其酶切后, 以 1:8 (V/V) 与毕赤酵母 X-33 感受态细胞混合, 转入预冷的 0.2 cm 电转杯中, 冰浴 5 min, 1.5 kV、25 F、200 Ω , 电击 5 ms, 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 的山梨醇, 离心后菌体涂布于含 100 μ g/mL 博来霉素的 YPDS 平板(1% 酵母提取物、2% 胰蛋白胍、2% D(+) 葡萄糖、1 mol/L 山梨醇、2% 琼脂), 30 °C 培养 72 h 至单克隆产生。

1.6 甲醇利用快速型酵母转化子的筛选和鉴定

挑取 10 个单菌落分别接种至 MM 平板(1.34% YNB、0.4 mg/L 生物素、5 mL/L 甲醇、15 g/L 琼脂)和 MD 平板(1.34% YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids)、0.4 mg/L 生物素、20 g/L 葡萄糖、15 g/L 琼脂)上, 筛选甲醇利用快速型转化子。对筛选到的酵母转化子提取基因组 DNA, 以此为模板, 采用 pPICZ α A 的通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1 进行 PCR 鉴定。

1.7 *mPtCrustin3* 的诱导表达及 Tricine-SDS-PAGE

挑取经鉴定无误的酵母转化子接种于 25 mL BMGY 培养基(1.34% YNB、0.4 mg/L 生物素、1% 甘油、100 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.0)中, 29 °C、250 r/min 培养至 OD_{600} 为 3.0-6.0; 离心(5000 r/min)收集菌体, 重悬于 100 mL BMMY 培养基(配方同 BMGY 培养基, 除了 1% 甲醇取代甘油)中, 调 OD_{600} 至 1.0, 30 °C、250 r/min 培养 96 h, 每隔 24 h 补加甲醇至总体积的 1.0%; 收集发酵培养液用作 Tricine-SDS-PAGE 分析, 浓缩胶浓度 4%, 夹层胶浓度 10%, 分离胶浓度 16.5%, 超低分子量蛋白标准由中科瑞泰(北京)生物科技有限公司提供。

2 结果

2.1 通过 PCR 扩增含酶切位点的 *mPtCrustin3* 基因

第一次 PCR 扩增到一个 557 bp 长度的片段(图 2-A)，该片段应编码 *PtCrustin3* 前体肽（由 N 端的信号肽和 C 端的成熟肽组成），并含部分 5'和 3'非编码区；以此片段为模板，第二次 PCR 扩增到一个 306 bp 的片段（图 2-B），该片段应编码 *PtCrustin3* 的成熟肽（*mPtCrustin3*），其 5'端和 3'端应分别含 *EcoRI*酶切位点和 6×His 标签；以此片段为模板，第三次 PCR 扩增到一个 315 bp 的片段(图 2C)，该片段的 3'端应含 *XbaI*酶切位点。最后一次 PCR 产物经克隆进 pMD-19T 质粒和 DNA 测序，证明两个限制性酶切位点和 6×His 标签被成功添加(图 3)；推断的氨基酸序列表明该基因编码 102 个氨基酸残基，除去 N 端的 2 个额外残基 (E, F) 和 C 端的 6 个组氨酸残基外，其余 94 个残基组成了 *mPtCrustin3* 区域，且 10 个高度保守的半胱氨酸残基位于该区域内。

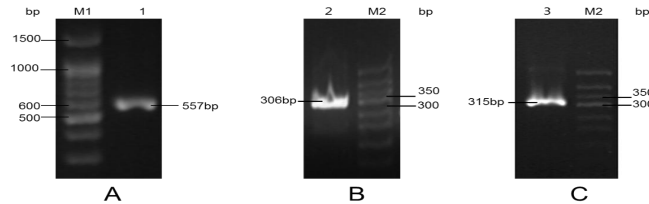


图 2 目的基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of target gene

M1, M2: DNA 分子量标准;1, 2, 3: 三次 PCR 扩增的产物

M1, M2: DNA marker; 1, 2, 3: Amplified products for three times PCR

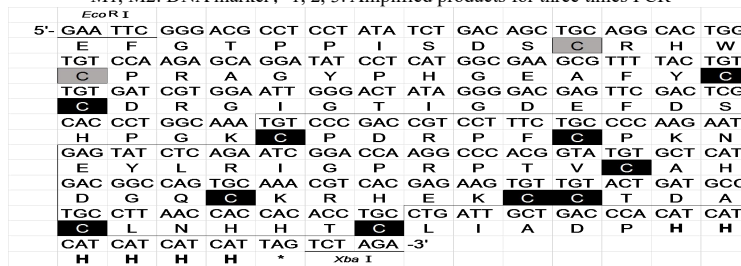


图 3 编码 *mPtCrustin3* 的 cDNA 及其推断的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *mPtCrustin3*

*为终止密码子;下划线为限制性酶切位点;黑色阴影为高度保守的半胱氨酸残基;灰色阴影为较保守的半胱氨酸残基;框内为 WAP 结构域。Star is stop codon; restriction endonuclease sites are underlined; highly conserved cysteine residues are shaded in dark; relatively conserved cysteine residues are shaded in grey; WAP domain is boxed.

2.2 不同来源 Crustin 之间氨基酸序列的比较

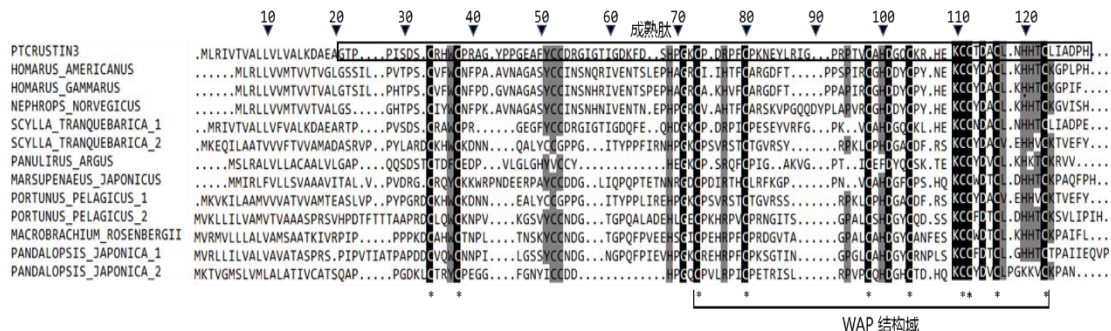


图 4 不同来源 Crustin 氨基酸序列的多重比较

Fig.4 Multiple comparison of Crustin amino acid sequence from different species

方框内为 *mPtCrustin3* 区域;黑色阴影为高度保守的残基;灰色阴影为较保守的残基;星号处表示高度保守的半胱氨酸残基

mPtCrustin3 area is boxed; highly conserved residues are shaded in dark; relatively conserved residues are shaded in grey;

highly conserved cysteine residues are marked by stars.

对不同来源 Crustin 一级结构的多重比对结果如图 4 所示，不同来源的 Crustin 氨基酸序列中显示了 14 个高度保守的氨基酸残基（黑色阴影），它们均位于成熟肽区域中，其中 11 个高度保守的残基位于 WAP 结构域区域，内有 8 个半胱氨酸残基在空间上可以形成 4 对二硫键，被认为与 Crustin 的稳定和抗菌活性有关，由此证明了 WAP 结构域的重要性。在被比较的甲壳类动物中，与 *PtCrustin3*

同源性最高的是远海梭子蟹同工型 1(76%),其次是眼斑龙虾(53%);其余来源的 Crustin 与 *PtCrustin3* 之间的氨基酸同源性在 37~44% (表 2)。

表 2 不同来源 Crustin 之间氨基酸序列的同源性

Table 2 Homology of the Crustin amino acid sequences among different species

物种 Species	三疣梭子蟹 Crustin 同工型 3 <i>PtCrustin3</i>
<i>Portunus pelagicus</i> 1	76
<i>Portunus pelagicus</i> 2	37
<i>Panulirus argus</i>	53
<i>Pandalopsis japonica</i> 1	44
<i>Pandalopsis japonica</i> 2	40
<i>Scylla tranquebarica</i> 1	40
<i>Scylla tranquebarica</i> 2	40
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	43
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	41
<i>Homarus gammarus</i>	39
<i>Homarus americanus</i>	37
<i>Nephrops norvegicus</i>	37

2.3 基于 Crustin 氨基酸序列的分子系统树分析

由图 5 可见,根据不同 Crustin 氨基酸序列构建的分子系统树可分为 1 个大的分支和 1 个小分支。三疣梭子蟹 *PtCrustin3* 和远海梭子蟹同工型 1 位于大分支下面的 1 个小分支,由自引导值 100 支持,证明它们之间的亲缘关系最近,该分子系统树的分析结果与氨基酸序列多重比对的结果基本一致。

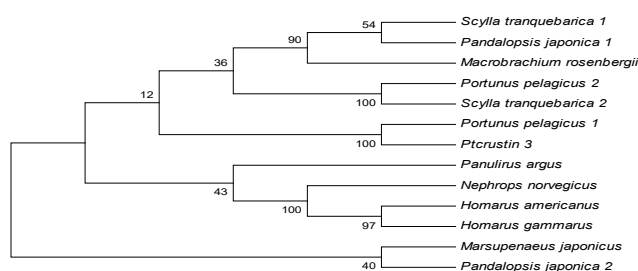


图 5 基于 Crustin 氨基酸序列的分子系统树

Fig.5 Molecular phylogenetic tree based on Crustin amino acid sequence

2.4 构建重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3* 及其鉴定

将上述经测序验证的 *mPtCrustin3* 片段与表达载体 pPICZ α A 连接以获得重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3*(图 6)。转化感受态细胞 DH5 α 后,使用载体上的引物 5'AOX1 和 3'AOX1 进行菌落 PCR 鉴定,由图 7A 可见,在约 835 bp 处有明显条带,与理论值相符;另一方面,采用 *Eco*RI 和 *Xba*I 对重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3* 进行双酶切验证,由图 7B 泳道 3 可见,仅显示了 1 个大分子量的条带(切下目的片段后剩下的载体片段),却未见 315 bp 目的片段的条带(可能由于浓度太低);但未酶切的阴性对照(泳道 4)显示了一个更大分子量的条带,初步证明重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3* 已构建成功。此外, DNA 测序结果也证明 *mPtCrustin3* 与 pPICZ α A 正确连接,未发生基因变异。

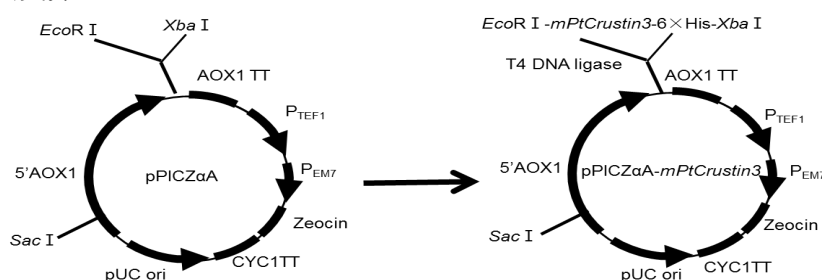


图 6 重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3* 的构建

Fig.6 Construction of recombinant expression vector pPICZ α A-*mPtCrustin3*

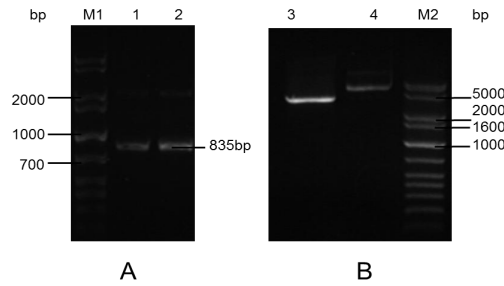


图 7 pPICZαA-mPtCrustin3 的菌落 PCR (A) 和双酶切鉴定 (B)

Fig.7 Identification of pPICZαA-mPtCrustin3 by colony PCR (A) and restriction endonuclease digestion (B)
 M1, M2: DNA 分子量标准; 1, 2: 菌落 PCR 产物; 3: pPICZαA-mPtCrustin3 的双酶切产物; 4: 未酶切的 pPICZαA-mPtCrustin3
 M1, M2: DNA marker; 1, 2: Colony PCR products; 3: Products digested by EcoRI and XbaI; 4: Undigested pPICZ α A-mPtCrustin3

2.5 酵母转化子的筛选及其鉴定

将重组表达载体 pPICZαA-mPtCrustin3 电转入毕赤酵母 X-33 细胞后, 经含 100 μg/mL 博来霉素的 YPDS 平板、MM 和 MD 平板筛选后, 获得 10 株甲醇利用快速型酵母转化子; 选择 2 株经 YPD 液体培养基过夜培养后, 提取其酵母基因组 DNA 为模板, 使用载体上的通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1 进行 PCR 验证, 如图 8 所示, 2 株样品均在 2200 bp 和 835 bp 处有明显条带, 前者为毕赤酵母 X-33 中因存在醇氧化酶基因 AOX1 自身的引物结合位点而扩增的条带, 后者为含目的基因的扩增条带, 与理论值相符。由此证明 pPICZαA-mPtCrustin3 成功嵌合进毕赤酵母基因组 DNA。

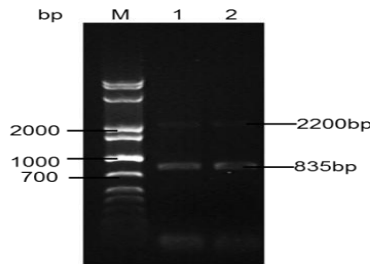


图 8 酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig.8 PCR identification of yeast transformants

M: DNA 分子量标准; 1, 2: PCR 产物
 M: DNA marker; 1, 2: PCR products

2.6 重组体 mPtCrustin3 的诱导表达及 Tricine-SDS-PAGE 分析

对上述筛选到的 1 号酵母转化子采用 BMM 培养基、1%甲醇诱导表达 96 h 后, 离心取上清用作 Tricine-SDS-PAGE 分析, 由图 9 可见, 与阴性对照 (含 pPICZαA 空质粒的酵母转化子) 相比, 该酵母转化子在小于 14.4 kD 处有明显的条带, 接近理论分子量位置 (11.6 kD), 证明重组体 mPtCrustin3 被成功表达。

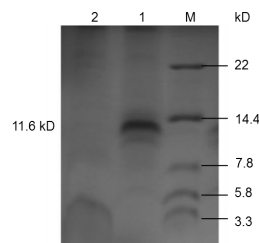


图 9 培养液上清的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig.9 Tricine-SDS-PAGE analysis for supernatants from culture solutions

M: 蛋白质分子量标准; 1: 含 pPICZαA-mPtCrustin3 的酵母转化子的培养液上清; 2: 含 pPICZαA 的酵母转化子的培养液上清
 M: Protein marker; 1: Medium supernatant for yeast transformant containing pPICZαA-mPtCrustin3;
 2: Medium supernatant for yeast transformant containing pPICZαA

3 讨论

迄今为止, 仅 Cui 等^[7]报道了三疣梭子蟹 *PtCrustin3* 成熟肽在大肠杆菌中的重组 DNA 表达, 并且是以融合蛋白的形式表达的, 显然不利于目的蛋白的获取。鉴于此, 本研究拟通过构建毕赤酵母

表达系统,以期实现三疣梭子蟹 *mPtCrustin3* 的真核重组表达,所选的宿主菌为野生型毕赤酵母 X-33,其对外源蛋白具有较好的分泌和适应能力^[10],有利于获得目的蛋白。由本研究结果可知,基本上已实现上述目标,但在进一步的研究中还有待于对有些方面进行改变和完善。例如,图9中1号泳道的目的条带下方还显示了1个淡条带,其原因分析如下:载体 pPICZ α A 中 α 因子信号肽的 N 端存在 Kex2 和 Ste13 两个切割位点,若在 Kex2 位点处被切割的话,目的片段 5'端的 *EcoR* I 与 Kex2 位点之间的序列会导致重组体 *mPtCrustin3* 的 N 端额外引入 6 个氨基酸残基;另一方面,虽然 Ste13 位点被切割的效率不高,但若在该位点被切割的话,可能导致重组体 *mPtCrustin3* 的 N 端引入 2 个或 4 个额外的氨基酸残基,由此获得分子量不同的目的蛋白。上述两种情况均不能获得天然的 N 末端,该结果是否会对重组体 *mPtCrustin3* 的空间结构以及生物学活性产生影响还有待于进一步的研究。进一步的研究将聚焦于选择合适的限制性内切酶,以期获得具有天然 N 末端的重组体 *mPtCrustin3*。

因本研究中目的蛋白在毕赤酵母中的表达量较低,故图9显示的是对发酵液上清进行浓缩处理后的电泳结果。关于表达量低的原因可能与使用的是天然 cDNA 有关,经分析,编码 *mPtCrustin3* 的 94 个氨基酸残基的天然密码子中有 7 个密码子对于毕赤酵母而言属于低频密码子。已有研究表明,对密码子进行优化可提高目的蛋白在毕赤酵母中的表达量^[11-14],因此在后续研究中将根据毕赤酵母的密码子偏爱性,对目的基因进行优化合成,以期提高目的蛋白的表达量。

4 结论

本研究通过 RT-PCR 从三疣梭子蟹鳃中克隆到编码 *PtCrustin3* 成熟肽的基因 *mPtCrustin3*,经巢式 PCR 获得含 *EcoRI*和 *XbaI*酶切位点及 6 \times His 标签的目的基因,经与 pPICZ α A 连接成功构建重组表达载体 pPICZ α A-*mPtCrustin3*,转化至毕赤酵母 X-33 后,在 29 $^{\circ}$ C、250 r/m 下,经 1%甲醇诱导培养 96 h 后,成功表达重组体 *mPtCrustin3*。本研究为进一步研究三疣梭子蟹 *PtCrustin3* 的功能及其应用奠定了良好基础。

参考文献

- [1] Relf JM, Chisholm JRS, Kemp GD, *et al.* Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab *Carcinusmaenas*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999,264(2):350-357
- [2] Mu C, Zheng P, Zhao J, *et al.* A novel type I crustin (CrusEs2) identified from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011,31(1):142-147
- [3] Smith VJ, Fernandes JMO, Kemp GD, *et al.* Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008,32(7):758-772
- [4] Afsal VV, Antony SP, Bright AR, *et al.* Molecular identification and characterization of Type I crustin isoforms from the hemocytes of portunid crabs, *Scylla tranquebarica* and *Portunus pelagicus*[J]. *Cellular Immunology*, 2013,284(1-2):45-50
- [5] Yu AQ, Shi YH, Wang Q. Characterisation of a novel Type I crustin involved in antibacterial and antifungal responses in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016,48(1):30-38
- [6] Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A, *et al.* Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2009,36(5):841-850
- [7] Cui Z, Song C, Liu Y, *et al.* Crustins from eyestalk cDNA library of swimming crab *Portunustris tuberculatus*: molecular characterization, genomic organization and expression analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012,33(4):937-945
- [8] Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, *et al.* Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2002,35(2):91-105
- [9] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. *Yeast*, 2005,22(4):249-270
- [10] 曹慕琛,徐健勇,罗立超,等.黑曲霉糖化酶基因的克隆及其在毕赤酵母 X-33 中的表达[J].*安徽农业科学*,2011,39(14):8226-8230
- [11] 宋长丰,陶 妍,赵冬梅,等.斑点叉尾鲷铁调素成熟肽在毕赤酵母中的表达及其抑菌活性[J].*农业生物技术学报*,2015,23(3):380-387
- [12] 简思美,蔡斌斌,吴 程,等.基因改造 AiiA 蛋白在毕赤酵母中的表达[J].*福建师范大学学报:自然科学版*,2015,31(6):55-63
- [13] 刘真英,李文利.密码子优化后的柞蚕溶菌酶在酵母中的表达及活性测定[J].*微生物学通报*,2016,43(2):292-300
- [14] 孙风敏,韩 焱,李文利.基于密码子优化的蛋白酶 K 在毕赤酵母中的表达及分离纯化[J].*微生物学通报*,2014,41(11):2198-2207