

文章编号:1000-0615(2009)06-1026-05

凡纳滨对虾精氨酸激酶的多克隆抗体制备 及组织特异性表达分析

姚翠鸾, 冀培丰, 孔鹏, 王志勇

(集美大学水产学院, 水产生物技术研究所, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要:精氨酸激酶(arginine kinase, AK)在调节无脊椎动物磷酸精氨酸与ATP之间能量平衡的过程中具有重要作用。在前期工作基础上,设计特异引物,以凡纳滨对虾肌肉组织cDNA为模版,克隆得到了1 071 bp的凡纳滨对虾精氨酸激酶的完整开放阅读框;将它克隆到原核表达载体pGEX-4T-2上,转化BL21(DE3)菌株,经诱导后表达出GST-AK融合蛋白。以纯化的融合蛋白作为抗原免疫小鼠,制备多克隆抗血清,经检测该抗原与抗体识别良好。利用得到的抗体对凡纳滨对虾AK在蛋白质水平上的特异性表达进行分析发现,精氨酸激酶在对虾的肌肉、心脏、神经、血细胞和胃组织中具有高的表达量,而在眼柄、肝胰腺、鳃和皮肤组织中表达量较低。为进一步研究精氨酸激酶在对虾体内的功能奠定了基础。

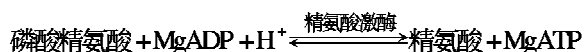
关键词:凡纳滨对虾;精氨酸激酶;多克隆抗体;组织表达

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),自然分布于秘鲁至墨西哥太平洋沿岸,在对虾渔捞业及养殖业中占有重要地位,是西半球最重要的养殖品种^[1],在泰国、巴西等国家其养殖业也已具相当规模。在我国,多年来凡纳滨对虾已经成为最主要的养殖品种,并且养殖量还在逐年增加。随着养殖业的发展,包括凡纳滨对虾在内的对虾病害问题也日趋严重,给生产造成了巨大的损失。为了更加有效地防治养殖对虾的疾病,有必要对其免疫抗病机制开展深入的研究。

精氨酸激酶(arginine kinase, AK, EC 2.7.3.3)是无脊椎动物体内的磷酸原—ATP磷酸转移酶,其功能类似于脊椎动物体内的肌酸激酶,通过催化如下反应,调控无脊椎动物体内ATP的浓度,是调控体内能量平衡的重要物质^[2]。



精氨酸激酶不仅在对虾的能量代谢中具有重要作用,一些研究者通过对对虾免疫调控机理进行研究,还发现在受到免疫多糖和病原刺激后,对虾体内的精氨酸激酶表达量发生了明显变

化^[3-8]。另外,不良环境也对虾类精氨酸激酶的表达产生重要影响^[9]。精氨酸激酶不仅在对虾能量代谢、免疫反应和适应不良环境中具有重要作用,同时它也是对虾的重要致敏原,引起人类食用对虾后的过敏,关于其过敏原性及生化和酶学性质也已有一些研究报道^[9]。

为进一步探讨精氨酸激酶在对虾体内的作用及其特性,本研究在前期工作的基础上,克隆了凡纳滨对虾精氨酸激酶完整开放阅读框的cDNA,以之进行原核表达,获得纯化的AK蛋白免疫小鼠,制备了其多克隆抗体,利用得到的多克隆抗体分析了凡纳滨对虾精氨酸激酶在蛋白水平上的组织特异性表达情况,为进一步深入研究精氨酸激酶在对虾抗病免疫等活动中的作用,及其与食用对虾安全性的关系提供重要的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雌性BALB/c小鼠由厦门大学医学动物实验中心提供。凡纳滨对虾购自厦门杏林对虾

收稿日期:2009-02-12 修回日期:2009-04-20

资助项目:国家自然科学基金(36071605);国家“九七三”重点基础发展规划(2006CB101804);集美大学创新团队基金(2006A001)

通讯作者:王志勇, E-mail: zywang@jmu.edu.cn

养殖场,体长(11.6±2) cm,体重(12.2±2) g。

1.2 AK 基因片段的克隆

用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen, USA) 提取凡纳滨对虾肌肉组织总 RNA, 逆转录成 cDNA, 根据本实验室克隆得到的凡纳滨对虾精氨酸激酶 (AK) 的全长 cDNA 序列 (GenBank: EU346737) 的完整开放阅读框设计一对引物, 在 5' 端和 3' 端分别加入 *Bam*H I / *Eco*R I 酶切位点序列, 引物序列为上游引物 5'-TTAGGATCCATGGCTGACGCTGCTGTTA-3'; 下游引物 5'-GCGGAATTCCTTACATCTCCTTCTCCATC-3' (引物由上海英骏生物技术公司合成)。以对虾肌肉组织 cDNA 为模板, 扩增目的片段。PCR 扩增的条件为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 回收纯化。

1.3 表达载体构建

PCR 扩增得到的包含 AK 完整开放阅读框的目的片段, 用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 进行双酶切后, 目的片段连接到载体 pGEX-4T-2 (Pharmacia) 上 (重组质粒命名为 pGEX-4T-2-AK), 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 小量制备质粒 DNA, 酶切检验后, 送上海英骏生物技术公司进行测序确认。

1.4 诱导表达

小量制备重组质粒 DNA, 将重组质粒导入大肠杆菌 BL21 (DE3), 经氨苄青霉素培养基筛选, 挑选阳性单克隆接种到 5 mL 培养基上, 37 °C 培养 12 h。然后, 取上述菌液按 1:100 稀释度转接于 200 mL 培养基中, 28 °C、250 r/min 振荡培养, 至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时, 加入诱导物 IPTG 使其终浓度分别达 0.1 mmol/L 与 1 mmol/L。分别于诱导后 2、4、6 h 取 1 mL 菌液, 10 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体, PBS 洗涤 3 次后, 适量菌体重悬于电泳上样缓冲液中, 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测重组蛋白的表达。确定在诱导后 4 h 时表达量最大。取表达阳性的菌落进行大量培养诱导, SDS-PAGE 分析^[10]。以带有未插入 AK 基因片段的 pGEX-4T-2 空质粒菌株及未经 IPTG 诱导的带有 pGEX-4T-2-AK 重组质粒菌株作为阴性对照。

1.5 目的蛋白的分离纯化

收集 IPTG 诱导后 4 h 的菌体, 离心洗涤, 低

温下超声波破碎菌体, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液 (含 GST-AK 融合蛋白), 上经预处理的含 Glutathione Sepharose 4B 介质的自制亲和层析柱, 洗脱, 收集目的蛋白, 用凝血酶水解去除表达蛋白的 GST 标签, 检测精氨酸激酶活性^[11]。

1.6 多克隆抗体的制备

将纯化的 AK 蛋白与弗氏完全佐剂 (Sigma) 等体积混合, 对 10 只 6~8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠进行腹腔注射免疫。初次免疫 7 d 后, 改用不完全佐剂, 每周加强免疫 1 次, 连续 4 周。小鼠末次免疫 3 d 后断尾取血, 室温凝集, 离心收集抗血清, 配制 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 和 1:128 稀释的抗血清, 双向免疫扩散实验检测抗体效价, 免疫血清利用填装 Protein A 的柱子进行纯化, 纯化后的抗体分装于 -80 °C 保存备用。

1.7 蛋白质印迹检测凡纳滨对虾 AK 蛋白的组织特异性表达

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶 (溶于 TBST 中) 封闭 1 h, 以 1:1 000 的比例加入抗凡纳滨对虾 AK 的多克隆抗体, 与膜杂交反应 1 h, TBST 多次漂洗, 再加 HRP 标记的羊抗鼠二抗杂交 1 h, 经 TBST 漂洗后, 用 TMB 显色^[12]。

从凡纳滨对虾血细胞、肝胰腺、鳃、皮肤、肌肉、心脏、神经、眼柄、胃和肠组织用蛋白裂解液 (50 mmol/L Tris, 1.0 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 去氧胆酸钠; 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 cocktail) 中提取总蛋白, 溶于蛋白裂解液。采用 Bradford 方法定量蛋白质后, 每个组织取 1 mg 蛋白质上样, 在 10% SDS-PAGE 上进行电泳, 然后转移到 PVDF 膜上, 蛋白质印迹 (Western-blotting) 检测 AK 在凡纳滨对虾各组织中的表达情况。实验经 3 次生物学重复。

2 结果

2.1 AK 基因片段扩增及重组质粒鉴定

以凡纳滨对虾肌肉组织 cDNA 为模板, 用特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 结果得到 1 071 bp 的条带, 该产物经酶切后与 pGEX-4T-2 载体连接, 得到 pGEX-4T-2-AK 质粒, 测序结果证实其包含了精氨酸激酶的完整 ORF, 与预先设计的完

全一致,证实包含 AK 完整编码区的 cDNA 已经完整插入原核表达载体中(图 1)。

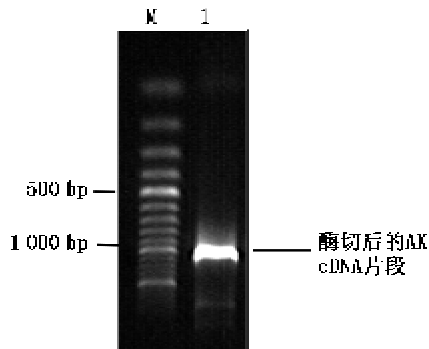


图 1 重组表达质粒 pGEX-4T-2-AK 的双酶切鉴定

M: 分子量标准;1:经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后的 pGEX-4T-2-AK 质粒

Fig. 1 Identification of recombinant expression plasmid pGEX-4T-2-AK digested by using *EcoR* I and *Bam*H I

M: DNA molecular weight marker; lane 1: pGEX-4T-2-AK digested by using *EcoR* I and *Bam*H I

2.2 凡纳滨对虾 AK 融合蛋白的诱导表达、纯化
将重组质粒 pGEX-4T-2-AK 转化 *E. coli* BL21(DE3),以不同浓度 IPTG 诱导、不同时间检测蛋白表达情况,结果显示在诱导后 4 h 时表达量达到最大,加入浓度为 0.1 mmol/L 与 1 mmol/L 的 IPTG 对重组蛋白的诱导表达没有表现出明显差异。故本实验采用加入 0.1 mmol/L 的 IPTG,28 °C 诱导后 4 h 为最佳表达条件。经 IPTG 诱导表达后,收集菌体,SDS-PAGE 分析后获得一个约 65 ku 的特异蛋白条带,与预期目标蛋白一致。亲和层析法纯化,经凝血酶酶切获得了分子量约 40 ku 的预期蛋白,复性后经检测具有 AK 活性,AK 比活性为 23.2 U/mg。

2.3 凡纳滨对虾 AK 多克隆抗体的制备及鉴定

纯化的重组表达的 AK 用生理盐水调整其浓度,以免疫前的小鼠血清作为阴性对照,AK 免疫的小鼠血清做不同稀释后,双向免疫扩散实验检测抗体效价达到 1:128 稀释度。

2.4 凡纳滨对虾 AK 蛋白组织特异性表达分析

提取凡纳滨对虾的血细胞、肝胰腺、鳃、皮肤、肌肉、心脏、神经、眼柄和胃等组织的蛋白质,用制备的多克隆抗体进行 Western-blotting 分析,检测 AK 在凡纳滨对虾体内的表达情况。结果表明,AK 在凡纳滨对虾的肌肉和心脏组织中表达量较

高,在血细胞、神经和胃组织中次之、而在肝胰腺、眼柄、皮肤和鳃组织中几乎检测不到其表达(图 2)。

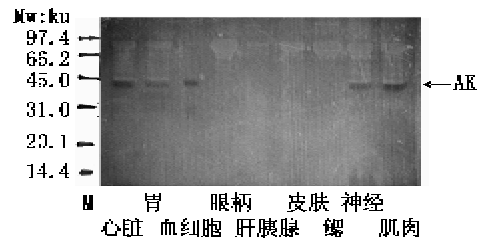


图 2 Western-blotting 检测凡纳滨对虾不同组织中 AK 的表达情况

Fig. 2 Expression of *L. vannamei* AK in different tissues, which was tested by Western-blotting

3 讨论

精氨酸激酶在无脊椎动物能量代谢中的作用已经得到广泛证实,最近的研究发现,它还与机体的病原识别、免疫反应等多种重要的生理过程密切相关^[3,5-9];因此,对精氨酸激酶的研究也日益引起重视。

本研究在本实验室前期获得凡纳滨对虾精氨酸激酶全长 cDNA 序列(GenBank: EU346737)的基础上,通过 GST 融合蛋白原核表达体系有效表达了重组的精氨酸激酶,通过对表达条件的探索,发现加入 0.1 mmol/L 的 IPTG,28 °C 诱导后 4 h 为最佳表达条件,并最终分离纯化得到了可溶性的正确表达产物。采用亲和层析的方法对目的蛋白进行纯化后,得到了电泳纯的重组表达凡纳滨对虾精氨酸激酶,切除 GST 标签后,检测到了酶活性;为酶的性质和应用研究奠定了基础。本研究还采用纯化得到的高纯度目的蛋白免疫小鼠,成功制备了抗精氨酸激酶的抗体,并采用制备的抗体,首次在蛋白质水平上对精氨酸激酶在凡纳滨对虾体内不同组织的分布进行了研究。多克隆抗体研制的成功,为对虾精氨酸激酶这种过敏原的检测、组织定位等提供了有用的工具。

本研究证实,不仅在对虾的肌肉组织中存在着大量的精氨酸激酶,在对虾的心脏、胃等肌性组织中,精氨酸激酶也有较高的表达量。此结果不仅证实而且丰富了 Furukohri 等^[13]及 France 等^[14]的研究结果,也说明 AK 与肌肉细胞运动过程中的能量爆发有关^[15]。本研究观察到对虾血

细胞中也存在较高的精氨酸激酶含量,提示精氨酸激酶催化的能量代谢反应可能与对虾血细胞介导的物质运输或者免疫反应相关,这也验证了前人发现的对虾血细胞中的精氨酸激酶在其免疫反应中发生明显变化的研究结果^[3,5-8]。在凡纳滨对虾中采用 Western-blotting 方法对精氨酸激酶的组织分布进行研究还发现,对虾的神经组织中精氨酸激酶的表达量也很高,与 Wang 等^[16]在锥虫中获得的结果一致,说明对虾的神经组织在进行神经信号传导的过程中可能也需要大量的能量,精氨酸激酶在神经传导方面可能也发挥着重要的作用。

本研究构建了凡纳滨对虾 AK 蛋白的原核表达载体,并探索出了诱导可溶性蛋白重组表达的最佳条件,获得了凡纳滨对虾 AK 的多克隆抗体,并在蛋白质水平上对精氨酸激酶的组织表达谱进行了分析,这些工作为深入研究 AK 在对虾各种组织及其生理活动中的作用和功能奠定了基础。精氨酸激酶不仅是对虾能量代谢的一种关键调控因子,也是对虾的一种重要的致敏原。对于精氨酸激酶的深入研究,还将有助于食用对虾导致的过敏性疾病的诊断和治疗。

参考文献:

- [1] Meehan D, Xu Z, Zuniga G, *et al.* High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Mar Biotech*, 2003, 5: 311-330.
- [2] Ellington W R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 289-325.
- [3] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, *et al.* Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19 (4): 317-329.
- [4] 姚翠鸾,王志勇,张瑞英,等. 凡纳滨对虾精氨酸激酶的分离及性质研究 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (5): 690-696.
- [5] 曾勇,路承平. 螯虾免疫相关基因的检出及丝氨酸蛋白酶抑制物基因分析 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11 (4): 319-324.
- [6] Astrofsky K M, Roux M M, Klimpel K R, *et al.* Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. *Arch Virol*, 2002, 147: 1799-1812.
- [7] Wang B, Li F, Dong B, *et al.* Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray [J]. *Mar Biotech*, 2006, 8 (5): 491-500.
- [8] Yao C L, Ji P F, Kong P, *et al.*, Arginine kinase from *Litopenaeus vannamei*: cloning, expression, enzymatic properties and interactive pathway [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2009, 26 (3): 553-558.
- [9] 姚翠鸾,王志勇,相建海. 甲壳动物精氨酸激酶的结构与功能 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 27 (3): 23-28.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [11] Yu Z, Gao D, Pan J, *et al.* Activity and structure changes of arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis* muscle in trifluoroethanol solutions [J]. *Tsinghua Science Technol*, 2003, 8 (4): 460-465.
- [12] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等(译). 北京:科学出版社,2002.
- [13] Furukohri T, Okamoto S, Suzuki T. Evolution of phosphagen kinase (III). Amino acid sequence of arginine kinase from the shrimp *Penaeus japonicus* [J]. *Zoolog Sci*, 1994, 11 (2): 229-234.
- [14] France R M, Sellers D S, Grossman S H. Purification, characterization, and hydrodynamic properties of arginine kinase from gulf shrimp (*Penaeus aztecus*) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 345: 73-78.
- [15] Grieshaber M K, Hardewig I, Kreutzer U, *et al.* Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1994, 125: 143-147.
- [16] Wang Y, Esbensen P, Bentley D. Arginine kinase expression and localization in growth cone migration [J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 987-998.

Preparation of polyclonal antibody and analysis of tissue specific expression of arginine kinase protein in *Litopenaeus vannamei*

YAO Cui-luan, JI Pei-feng, KONG Peng, WANG Zhi-yong

(Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety of Fujian Province University, Fisheries Biotechnology Institute, College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Arginine kinase (ATP: arginine N-phosphotransferase, AK) in invertebrates catalyzes the reversible phosphorylation of arginine by MgATP to form phosphoarginine and MgADP. The conventional view is that phosphoarginine functions as ATP buffers, permitting maintenance of high ATP values during periods in burst of cellular activity in invertebrates. In this paper, the open reading frame (ORF) was cloned from shrimp, *Litopenaeus vannamei*, based on the full-length cDNA sequence that was obtained in our previous study. The ORF encoding 356 amino acids of AK was cloned and inserted to a prokaryotic expression vector pGEX-4T-2. The recombinant protein was expressed as glutathione S-transferase (GST) arginine kinase (GST-AK) fusion protein, which was purified by affinity chromatography using Glutathione Sepharose 4B. The anti-AK polyclonal antibody was prepared by immunization of mice using this purified AK protein. The specific recognition of anti-AK antibody was further verified. The AK protein expression in various tissues was then analyzed using this newly prepared antibody by Western-blotting. The results revealed a strong expression of AK in heart, nerve, hemocyte, stomach and muscle, weak expression in eyestalk, hepatopancrease, gill and skin. The present study may be very useful for studying the function of AK in shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; arginine kinase; polyclonal antibody; tissue expression