

文章编号:1000 - 0615(2005)01 - 0020 - 05

斑节对虾溶菌酶基因的原核表达与产物活性检测

郑清梅^{1,2}, 叶 星¹, 白俊杰¹, 吴锐全¹, 劳海华¹, 罗建仁¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:采用 PCR 方法对所克隆的斑节对虾溶菌酶基因的 cDNA 进行改造,并克隆至含温控启动子 P_RPL 的大肠杆菌表达质粒 pBV220,构建斑节对虾溶菌酶表达载体 pBV220-lyz。该质粒转化大肠杆菌后经 42 °C 诱导表达。SDS-PAGE 电泳表明,表达产物中有 16kD 左右的特异性条带,与预期斑节对虾溶菌酶分子量相符。薄层扫描显示,重组斑节对虾溶菌酶约占全菌总蛋白的 32%,纯化后的重组斑节对虾溶菌酶占全菌可溶性蛋白的 90% 左右。比浊法检测活性后产物的生物活性,结果表明重组斑节对虾溶菌酶的最适 pH 为 6.0,最适温度为 40 °C。测定了重组斑节对虾溶菌酶对溶壁微球菌和几种鱼病原菌株的溶菌活力,结果表明,重组斑节对虾溶菌酶对溶壁微球菌、溶藻弧菌和鳃弧菌有较强的溶菌活力,对爱德华氏菌有一定的溶菌活力,对嗜水气单胞菌、副溶血弧菌和大肠杆菌 DH5 溶菌活力较弱。

关键词:斑节对虾;溶菌酶基因;原核表达;溶菌活性

中图分类号:S917

文献标识码:A

Expression of *Penaeus monodon* lysozyme gene in prokaryocyte system and evaluation of its lytic activity

ZHENG Qing-mei^{1,2}, YE Xing¹, BAI Jun-jie¹, WU Rui-quan¹, LAO Hai-hua¹, LUO Jian-ren¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract:The c-type lysozyme cDNA of *Penaeus monodon* cloned previously in our lab (GenBank accession no. AF539466) was modified by PCR to delete the signal peptide and subcloned to pBV220 expression vector which contains P_RPL promoter to construct the recombinant vector pBV220-lyz. pBV220-lyz was transformed to *E. coli* DH5 and then induced to express at 42 °C. A specific band about 16kD in molecular mass was showed by SDS-PAGE analysis, which was larger than those from other species such as human, fish and insects (about 14kD). The recombinant *P. monodon* lysozyme existed as inclusion bodies in the cells. The inclusion bodies were collected, washed and then dissolved. And finally the target protein was dialyzed in order to recover its biological activity. Scanned and quantified by the Analysis System of Biology Image showed that the recombinant lysozyme accounted for 32% of the total cell protein, and was about 90% after purification. The biological activity of the recombinant protein was evaluated by turbidimetric assay described by Hultmark. The optimum pH and temperature of the lytic activities of the recombinant lysozyme were 6.0 and 40 °C, respectively. The recombinant protein was found to possess potent lytic activities against *Micrococcus lysodeikticus* 1-634, *Vibrio alginolyticus* As1.1833 and *V. anguillarum* E3-11. And it has some lytic activities against *Edwardsiella tarda* E 895205 but with little lytic activities against *Aeromonas hydrophila* AhG1, *V. parahaemolyticus* As1.1615 and *E. coli* DH5. The standard lysozyme (lysozyme from chicken egg white) showed lower lytic activities against *Micrococcus lysodeikticus* 1-634, *Vibrio alginolyticus* As1.1833 and *V. anguillarum* E3-1 compared with that of the recombinant protein. The present study suggests the potential application of the recombinant *P. monodon* lysozyme in aquaculture.

Key words: *Penaeus monodon*; lysozyme gene; prokaryocyte expression; lytic activities

收稿日期:2003-08-05

资助项目:广东省自然科学基金项目(20010673)

作者简介:郑清梅(1978-),女,广东茂名,硕士,现工作单位为广东梅州嘉应学院。E-mail:zhqm78@163.net

通讯作者:叶 星, Tel: 020-81616127, E-mail:yexing@163.net

溶菌酶(lysozyme, EC 3.2.1.17)属于 α -乳白蛋白家族,广泛存在于自然界动植物和微生物的组织、体液及分泌物中^[1,2]。它能切断肽聚糖中N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4糖苷键,使细菌溶解死亡^[3]。此外溶菌酶还可诱导调节机体其他免疫因子的合成与分泌、协同其它免疫因子进行防御免疫^[4]。近年来,对虾血清溶菌酶生化特征的研究表明对虾血清具有溶菌酶活性^[5]。Rojtinnakorn等^[6]用表达序列标签法(EST)研究了被对虾白斑综合征病毒(WSSV)感染后的日本对虾免疫基因表达情况,发现溶菌酶是其重要的抗菌蛋白之一。

溶菌酶基因工程研究始于上世纪80年代中期,其中人溶菌酶和鸡蛋清溶菌酶的基因工程研究已取得很大进展,在大肠杆菌和酵母中获得了具有生物活性的人溶菌酶和鸡蛋清溶菌酶^[7-10]。水产动物溶菌酶基因工程研究还较少。最近,Hiikima等^[11]从日本牙鲆的肾脏cDNA文库中获得 α -型溶菌酶基因,并在昆虫细胞中表达^[2]。有关对虾溶菌酶基因工程的研究还未见报道。本实验从斑节对虾血细胞总RNA中扩增获得斑节对虾溶菌酶基因(GenBank序列号为AF539466)^[12],所构建的斑节对虾溶菌酶表达载体pBV220-lyz在大肠杆菌中表达,并对表达产物的活性进行了测定,为进一步开展斑节对虾溶菌酶的功能研究与开发应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

斑节对虾溶菌酶基因cDNA重组质粒pGEM-T-lyz由本实验室构建。鱼病原菌:嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) AhG1株、爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) E 895205株、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) As1. 1615株、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) As1. 1833株、鳃弧菌(*V. anguillarum*) E3-11株,以及标准菌溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) 1-634株由本所鱼病室提供。质粒pBV220和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5菌株由本室保存。限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自华美生物工程公司。PCR纯化试剂盒及有关试剂为Promega公司和华美生物工程公司产品。标准溶菌酶样品(即鸡蛋清溶菌酶)购自北京鼎国生物技术发展中心(C144-1, 60 000

U \cdot mg⁻¹)。

1.2 方法

引物设计与PCR扩增及重组子pBV220-lyz的构建 设计5'端引物从斑节对虾溶菌酶基因ORF的第19个氨基酸开始扩增(前18个氨基酸是其信号肽序列)。5'端引物P1共有23个碱基:5'-CG CAA TTG ATG AAG GTC TTC AGG-3',该引物除了与编码成熟肽的前4个氨基酸残基的正链序列一致外,加入了与EcoR I互补的Mun I识别序列CAA TTG。3'端引物P2:5'-CG CTG CAG TCA TTA GAA TGG GAA -3'。以pGEM-T-lyz为模板,P1、P2为引物,进行PCR扩增。PCR产物纯化后亚克隆至pBV220,筛选重组子pBV220-lyz。

重组子pBV220-lyz的诱导表达与SDS-PAGE鉴定 含有重组子pBV220-lyz的大肠杆菌DH5在3mL LB培养基中30℃培养过夜。次日按1:50扩大培养,30℃培养至OD₆₀₀为0.5~0.6后,立即转到42℃热诱导4h。离心收集菌体,15% SDS-PAGE电泳分析。FR-1000生物图像分析系统扫描分析重组斑节对虾溶菌酶占全菌总蛋白的百分比。

斑节对虾溶菌酶的初步纯化与透析复性 热诱导结束后离心收集菌体。超声波破碎细胞、离心收集包涵体。包涵体先用含2mol \cdot L⁻¹尿素的洗涤液洗涤2次,然后用8mol \cdot L⁻¹尿素溶解液溶解包涵体,再经透析液逐步透析除去尿素并使产物复性。扫描分析纯化后重组斑节对虾溶菌酶占全菌可溶性蛋白的百分比。

重组斑节对虾溶菌酶相对酶活力的测定 用Bradford测定法检测复性后的重组斑节对虾溶菌酶总蛋白含量,结合扫描分析的百分比计算重组斑节对虾溶菌酶的浓度。酶活力测定参照Hultmark^[13]的方法,以标准菌株溶壁微球菌作底物。测定酶活力最适pH时,将溶壁微球菌冻干粉用0.1mol \cdot L⁻¹磷酸钾盐缓冲液(pH取值范围为4.5~8.5,间隔0.5)配成底物悬液(OD₅₇₀=0.3)。分别取3mL底物悬液与100 μ L重组斑节对虾溶菌酶(200 μ g \cdot L⁻¹)迅速混匀转入比色皿中,读取波长570nm处的吸光值A₀,然后37℃水浴30min,取出后立即冰浴10min以终止其反应。混匀后再读取其A值。测定酶活力最适温度时,所设温度范围为15~55℃,以5℃为间隔。将混

合物分别于不同温度水浴 30min。测定方法如上。重组斑节对虾溶菌酶的相对酶活力 $U_L = (A_0 - A) / A$ 。上述测定均以鸡蛋清溶菌酶 ($200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作对照组。并同法测定未经溶解复性的包涵体的活性。

抗菌谱的测定 分别以标准菌株溶壁微球菌、鱼病原菌嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、鳗弧菌以及大肠杆菌 DH5 菌株共 7 种菌的冻干粉为底物,用 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.2) 配成底物悬液 ($\text{OD}_{570} = 0.3$),分别与 $100 \mu\text{L}$ 重组斑节对虾溶菌酶和 $100 \mu\text{L}$ 标准溶菌酶 (浓度均为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 混匀后测其 A_0 ,然后 37°C 水浴 30min,测其 A 值。相对酶活力 U_L 计算方法同上。

2 结果

2.1 重组子的鉴定

斑节对虾溶菌酶成熟肽基因序列内部靠近 5' 端约 20bp 处含有 1 个 *EcoR* 识别序列,重组子经 *EcoR* 与 *Pst* I 酶切后获约 400bp 的片段,与预期大小相符合 (图 1)。重组子序列测定表明所构建的 pBV220-lyz 质粒序列正确,所插入的斑节对虾溶菌酶成熟肽序列 423bp,与本实验室登录 GenBank 的序列自第 55 位碱基开始至终止密码子完全一致 (序列参见 AF539466)。

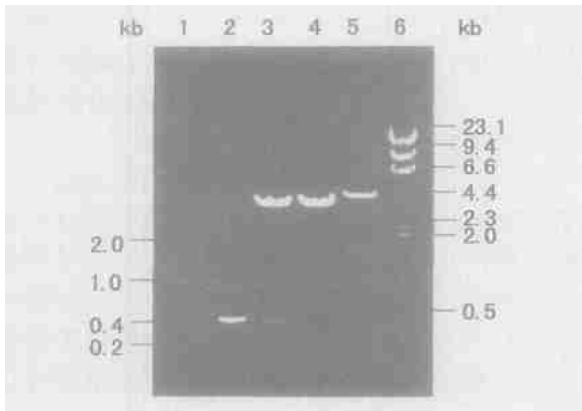


图 1 PCR 产物和重组质粒的鉴定

Fig. 1 The PCR products and identification of the recombinant plasmid

1. 200bp DNA 分子标准; 2. PCR 产物; 3. 重组子 *EcoR* / *Pst* 酶切; 4. 空载体 *Pst* 酶切; 5. 重组子 *Pst* 酶切; 6. DNA/*Hind* 分子标准
1. 200bp DNA marker; 2. PCR products; 3. pBV220-lyz/ *EcoR* / *Pst* ; 4. pBV220/ *Pst* ; 5. pBV220-lyz/ *Pst* ; 6. DNA/ *Hind* marker

2.2 基因工程菌的表达与产物初步纯化

SDS-PAGE 结果表明, pBV220-lyz 经 42°C 诱导后在分子量约 16 kD 处有一条特异蛋白带,与预期的分子量大小相符,比标准溶菌酶分子大 2 kD 左右。扫描结果表明该特异蛋白约占全菌总蛋白的 32%。初步纯化后其含量约占全菌总蛋白的 90% (图 2)。

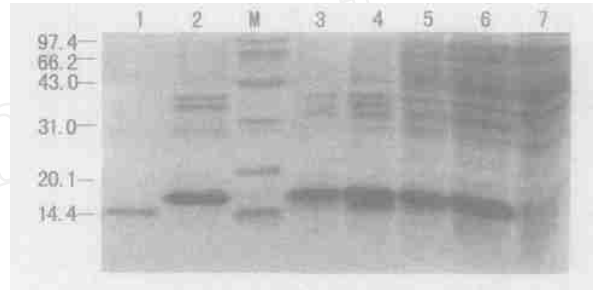


图 2 SDS-PAGE 检测初步纯化的表达产物

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified expression product

M. 低分子量蛋白标准; 1. 标准溶菌酶 (14.4kD); 2, 4. 包涵体; 3. 纯化后的包涵体; 5~6. 重组菌总蛋白质; 7. 含空载体的全菌总蛋白质
M. low molecular weight protein marker; 1. standard lysozyme (14.4kD); 2, 4. inclusion bodies; 3. purified inclusion bodies; 5, 6. total protein of DH5 containing pBV220-lyz; 7. total protein of DH containing pBV220

2.3 pH、温度对重组斑节对虾溶菌酶相对酶活力的影响

酶相对活力测定结果表明,以包涵体形式存在的重组斑节对虾溶菌酶不具有生物活性。但包涵体经洗涤、溶解、透析复性后具有明显的溶菌酶活性。在 pH4.5 ~ 8.5 范围内重组斑节对虾溶菌酶均有溶解溶壁微球菌的活力。重组斑节对虾溶菌酶适宜的 pH 范围为 5.0 ~ 6.5, 最适 pH 为 6.0 (相对酶活力 U_L 为 0.16)。标准溶菌酶的 U_L 在 pH8.5 时最高 (U_L 为 0.15) (图 3)。温度对重组斑节对虾溶菌酶和标准溶菌酶活力的影响程度相似。在 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ 时二者的相对酶活力均较高,重组斑节对虾溶菌酶 U_L 为 0.12 ~ 0.17, 标准溶菌酶 U_L 为 0.11 ~ 0.13。可认为重组斑节对虾溶菌酶最适温度为 40°C , 标准溶菌酶则为 45°C (图 4)。

2.4 重组斑节对虾溶菌酶的抗菌谱

重组斑节对虾溶菌酶对溶壁微球菌、鳗弧菌和溶藻弧菌有较强的溶菌活力 (U_L 为 0.14 以上), 对爱德华氏菌有一定的溶菌活力 (U_L 为 0.06),

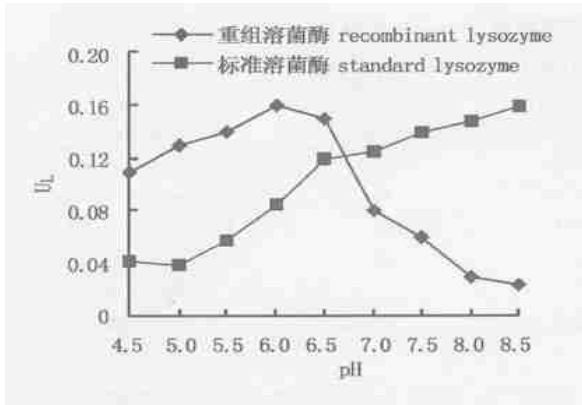


图3 pH对重组斑节对虾溶菌酶相对活力的影响
Fig. 3 Effect of pH on the recombinant lysozyme activities

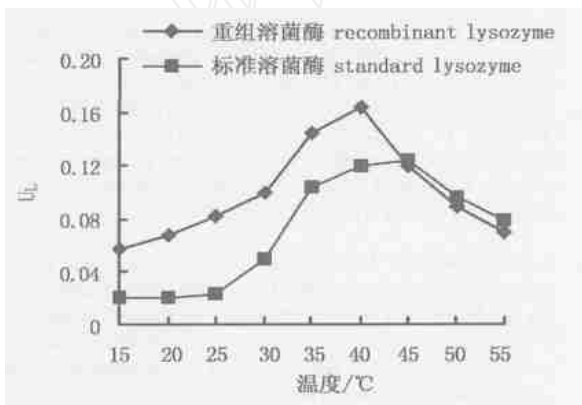


图4 温度对重组斑节对虾溶菌酶相对活力的影响
Fig. 4 Effect of temperature on the recombinant lysozyme activities

而对嗜水气单胞菌、副溶血弧菌和大肠杆菌 DH5 仅有微弱的溶菌活力,其 U_L 低于 0.05。标准溶菌酶对溶壁微球菌、鳃弧菌和溶藻弧菌有溶菌活力 (U_L 为 0.1),但活力比重组斑节对虾溶菌酶的稍低(图 5)。

3 讨论

来源于人、鸟类、鱼类和昆虫的 c-型溶菌酶,其成熟肽约由 130 个氨基酸残基组成,分子量为 14kD 左右。本实验获得的重组斑节对虾溶菌酶由 140 个氨基酸残基组成,分子量约 16kD。与其它生物的 c-型溶菌酶氨基酸序列相比,斑节对虾溶菌酶在其氨基酸序列的第 120~126 位和羧基端(150~158 位)共增加了 15 个氨基酸残基。所增加的氨基酸残基处于酶催化中心之外,估计不

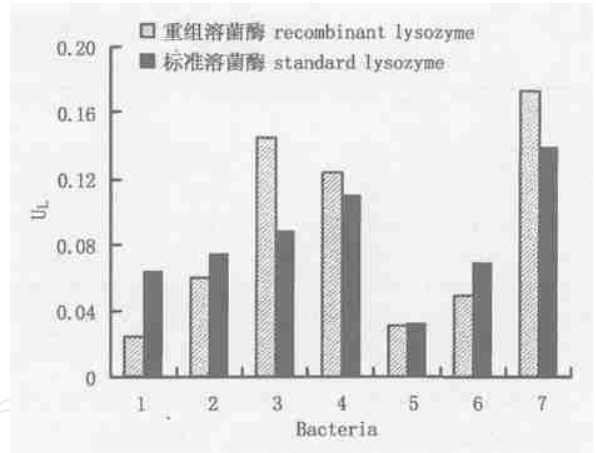


图5 重组斑节对虾溶菌酶的抗菌谱
Fig. 5 Antibacterial spectra of the recombinant lysozyme

1. 嗜水气单胞菌 AhG1 株; 2. 爱德华氏菌 E 895205 株; 3. 鳃弧菌 E3-11 株; 4. 溶藻弧菌 As1. 1833 株; 5. 副溶血弧菌 As1. 1615 株; 6. 大肠杆菌 DH 株; 7. 溶壁微球菌 1-634 株
1. *Aeromonas hydrophila* AhG1; 2. *Edwardsiella tarda* E 895205; 3. *Vivrio anguillarum* E3-11; 4. *V. alginolyticus* As1. 1833; 5. *V. parahaemolyticus* As1. 1615; 6. *E. coli* DH5; 7. *Micrococcus lysodeikticus* 1-634

影响其构象及活性。Irwin 和 Gong^[14]认为,c-型溶菌酶与哺乳动物和鸟类的 g-型溶菌酶均具有信号肽,属于分泌型蛋白,同时 4 个分子内二硫键使分子呈紧密椭圆形有助于溶菌酶分泌到胞外。斑节对虾溶菌酶具有 18 个氨基酸残基的信号肽和 8 个保守的半胱氨酸残基,由此推测为分泌型表达蛋白。本实验对斑节对虾溶菌酶的 cDNA 进行改造,去除信号肽序列。针对斑节对虾溶菌酶成熟肽内部含 *EcoR* I 识别序列 GAATTC,改造斑节对虾溶菌酶 cDNA 5' 端时选用与 *EcoR* I 互补的 *Mun* I 识别序列。带有 *Mun* I 识别序列的斑节对虾溶菌酶 cDNA 经 *Mun* I 酶切后产生与 *EcoR* I 识别序列对合的末端,既可与经 *EcoR* I 酶切的 pBV220 互补连接,又可维持合适的 SDS 序列距离,使重组表达质粒顺利地在大肠杆菌中高效表达。

pH 与温度是影响溶菌酶活力的主要理化因子。表 1 是重组斑节对虾溶菌酶与其它生物溶菌酶的最适 pH 与温度的比较。pH 与温度对溶菌酶活力影响的差异可能与酶结构差异有关。重组斑节对虾溶菌酶对常见鱼病原菌菌株的溶菌作用显示其在水产养殖上具有潜在的应用前景。

表 1 重组斑节对虾溶菌酶与其它生物溶菌酶的最适 pH 与温度比较

Tab.1 Optimum pH and temperatures of lysozymes of *P. monodon* and other species

种类 species	来源 source	最适 pH optimum pH	最适温度() optimum temperature	参考出处 reference
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	重组(c-type) recombinant	6.0	40	本实验 this paper
日本牙鲆 <i>Paralichthys olivaces</i>	重组(c-type) recombinant	5.0 ~ 6.5	40	Sonomi, et al. [2]
日本牙鲆 <i>Paralichthys olivaces</i>	重组(g-type) recombinant	6.0	25	Jun-ichi, et al. [15]
虹鳟 <i>Salmo gairdneri</i>	肾脏(c-type) kidney	5.5	45	Grinde, et al. [16]
家蚕 <i>Samia cynthia ricini</i>	重组(c-type) recombinant	6.0 ~ 6.5	-	Soushi, et al. [4]
鸡蛋清 chicken egg white	鸡蛋清(c-type) egg	8.0	45	Sonomi, et al. [2]

本实验完成过程得到本所鱼病室石存斌、潘厚军两位副研究员的大力支持,谨致谢意!

参考文献:

- [1] Carninci P, Hayashizaki Y. High-efficiency full-length DNA cloning[J]. Meth Enzymol, 1999, 303: 19 - 44.
- [2] Sonomi M, Jun-ichi H, Ikuo H, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells[J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 439 - 445.
- [3] Won J L, Paul T B. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori* [J]. Gene, 1995, 161: 199 - 203.
- [4] Soushi F, Izumi T T, Keiko K, et al. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 128B: 709 - 718.
- [5] Haug T, Kjuul A K, Stensvag K, et al. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(5): 371 - 385.
- [6] Rojtinakern J, Hirono I, Itami T, et al. Gene expression in haemocytes of Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13(1): 69 - 83.
- [7] Muraki M, Jigami Y, Tanaka H, et al. Expression of synthetic human lysozyme gene in *Escherichia coli* [J]. Agric Biol Chem, 1985, 49: 2829 - 2831.
- [8] Maria J C, Walter S, G üther R A, et al. Cloning of human lysozyme gene and expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Gene, 1988, 66: 223 - 234.
- [9] Takaki H, Asae T, Ryuji M, et al. Expression of human lysozyme in an insoluble form in yeast [J]. Gene, 1987, 56: 53 - 59.
- [10] Oberto J, Davison J. Expression of chicken egg white lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Gene, 1985, 40(1): 57 - 65.
- [11] Hikima J, Hirono I, Aoki T. Characterization and expression of c-type lysozyme DNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Mar Biol Biotech, 1997, 6(4): 339 - 344.
- [12] 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因克隆及序列分析[J]. 水生生物学报, 2004, 28(4).
- [13] Hultmark D. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7 - 16.
- [14] Irwin D M, Gong Z M. Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes [J]. J Mol Evol, 2003, 56(2): 234 - 242.
- [15] Jun-ichi H, Sonomi M, Ikuo H, et al. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein [J]. Biochemica et Biophysica Acta, 2001, 1520: 35 - 44.
- [16] Grinde B, Joll é J, Joll é P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout *Salmo gairdneri* [J]. Eur J Biochem, 1988, 173: 169 - 273.