

海带配子体中孢子形成相关蛋白(SRP)基因的克隆及其原核表达

陈晶¹, 王丽丽¹, 石微微¹, 周志刚^{1,2*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学E-研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 从已构建好的海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库中, 通过 Southern 点杂交及序列分析, 发现一未知功能的差异表达基因片段(克隆 b9)。首先根据该克隆序列设计基因特异性引物, 利用 cDNA 末端快速扩增技术, 自雄配子体中克隆了一条长 831 bp 的 cDNA 序列, 其中开放阅读框 450 bp, 5'-非翻译区 182 bp, 3'-非翻译区 199 bp 且具有明显的 poly(A) 尾巴。同样利用 PCR 方法自雌配子体中克隆了该基因的 cDNA 序列, 它与雄配子体的完全一致。蛋白同源搜索结果显示, 该基因编码蛋白与点形念珠藻含有 SpoIID/LytB 结构域蛋白(SpoIID/LytB domain-containing protein; 一种孢子形成时起作用的蛋白质)具有 30% 相似性, 故暂命名为孢子形成相关蛋白基因(sporulation-related protein gene, *srp*) (GenBank 登录号: EF490313)。然后构建了 *srp* 基因原核表达载体 pET-28a-*srp*, 并将其转化至大肠杆菌 BL21 中进行表达, 获得了分子量大小约 19.3 ku 的目的蛋白, 且表达量与诱导物 IPTG 的量成正比。通过高效液相色谱-质谱分析证实, 重组蛋白的氨基酸序列与推测的目的蛋白一致。最后纯化重组了 SRP 蛋白并制备其多克隆抗体, 利用该抗体并运用 Western 印迹技术, 在海带配子体中证实 SRP 蛋白的存在。

关键词: 海带; 配子体; *srp* 基因; 原核表达; 高效液相色谱-质谱法

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

海带 (*Laminaria japonica* Aresch) 隶属褐藻门 (Phaeophyta)、海带目 (Laminariales), 是我国海水养殖业中一种重要的经济藻类, 其养殖产量居世界首位^[1]。培养的海带不仅具有较高的经济价值, 而且对近海海洋环境与海水养殖业的可持续发展起着至关重要的作用。海带生活史具有明显的大型孢子体和微型配子体的异型世代交替。海带孢子体为雌、雄同体, 它在成熟过程中, 带片上的孢子囊母细胞经过减数分裂产生并释放出游动孢子, 后者在生长环境适宜时, 因遗传基础的不同分别发育成雌、雄配子体^[2]。

史西志等^[3]以海带配子体为材料, 按 PCR-SelectTM cDNA 消减试剂盒 (Clontech 公司) 方法分别进行正向 (雄配子体为实验方、雌配子体为

驱动方) 和反向 (雌配子体为实验方、雄配子体为驱动方) 抑制消减杂交, 将正向消减的 PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 并转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 中, 构建雄配子体差异表达的 cDNA 消减文库。自 750 个阳性克隆中随机挑选 100 个进行 PCR 扩增鉴定, 电泳图谱表明插入片段大小在 200 ~ 1 000 bp 之间。进一步经过 Southern 斑点杂交筛选后, 选取 10 个阳性克隆进行测序和序列分析, 其中 3 个与已知功能基因的部分序列有较高的同源性, 7 个初步判断为新基因片段。对该文库的克隆进行序列分析后可知, 67.03% 的非冗余序列都未知其功能^[4]。

本研究根据 Southern 斑点杂交呈阳性的

收稿日期: 2010-04-12 修回日期: 2010-05-30

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30471328, 30671627); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科项目 (J50701); 教育部水产种质资源发掘与利用省部共建重点实验室资助项目 (KFT2008-7)

通讯作者: 周志刚, Tel: 021-61900424, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

b9 克隆这一未知功能基因 cDNA 片段设计特异引物,首先利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE),克隆该基因的 cDNA 序列;然后运用基因工程原理构建了原核表达载体 pET28a-srp,在大肠杆菌 BL21 中成功地表达,并获得其多克隆的抗体;最后通过 Western 印迹技术在海带配子体的粗蛋白提取液中证实 SRP (sporulation-related protein) 蛋白的存在。这些研究为后续从海带配子体中提取该基因编码蛋白 SRP、分析其特征及探讨它在配子体生长发育中的作用等奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 海带配子体培养

海带雌 (RF ♀ 22)、雄 (RF ♂ 40) 配子体无性繁殖系,按已报道的方法^[5]分离建成,并在 PES 培养基^[6]中培养。培养条件为温度 (17 ± 1) °C、光强 40 μmol photons/(m · s) 和光周期 16 L: 8 D^[5]。

1.2 海带配子体 *srp* 基因 cDNA 全长序列克隆

离心收集海带配子体,利用 TRIzol (Invitrogen 公司)法提取总 RNA。利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE),按照 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech 公司)操作步骤,首先反转录合成 5'-RACE 和 3'-RACE 的 cDNA。反应体系包括 1 μL 总 RNA,5'-(或 3'-)RACE CDS Primer 1 μL (12 μmol/L),SMART II A Oligo 1 μL (12 μmol/L),加无菌水至 5 μL,70 °C 温育 2 min,冰

上冷却 2 min。然后加入 5 × 第一链缓冲液 (Clontech 公司) 2 μL, DTT 1 μL (20 mmol/L), dNTPs (Promega 公司) 1 μL (10 mmol/L), MMLV 反转录酶 1 μL (200 U/μL), 42 °C 反应 1.5 h, 100 μL tricine-EDTA 缓冲液 (Clontech 公司) 稀释, 72 °C 反应 7 min。然后应用降落 PCR 进行雄配子体 *srp* (sporulation-related protein gene) 基因 cDNA 片段的克隆。根据海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库中筛选到的克隆 b9 序列^[3],设计基因特异性引物 (gene specific primer, GSP): GSP₁ 5'-GGCGGCAAGTCTCTTCACATTCC-3', GSP₂ 5'-TCGGAAGAAGGAGTCGTATGCCGTGAG-3'。25 μL 反应体系包括 10 × Advantage 2 PCR 缓冲液 (Promega 公司) 2.5 μL, dNTPs 0.5 μL (10 mmol/L), GSP₁ 引物 (5'-RACE) 或 GSP₂ 引物 (3'-RACE) 0.5 μL (10 μmol/L), 10 × 通用引物混合物 2.5 μL (100 μmol/L), 5'-(或 3'-)RACE cDNA 1.5 μL (约 1.5 ng), 50 × Advantage 2 Polymerase Mix (Promega 公司) 0.5 μL 以及 H₂O 17 μL。反应参数为 94 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

1.3 生物信息学分析 *srp* 基因及 SRP 蛋白质

获得 *srp* 的 cDNA 全长序列后,对其序列及其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析,所用到的网络服务器及序列分析软件分别见表 1、表 2。

表 1 序列分析网络服务器

Tab. 1 Web servers employed in the sequence analyses

服务器 web server	功能 function	网址 internet
BLAST	同源序列搜索	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAST	序列比对	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
SignalP 3.0	蛋白质信号肽分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
ComputeI/MW	蛋白质等电点和分子量预测	http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html
ORF Finder	开放阅读框搜索	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
PROSITE	蛋白质功能域查找	http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/
SMART	蛋白质结构域分析	http://smart.embl-heidelberg.de/
motif-scan	蛋白质功能域查找	http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan
PHYRE	蛋白质三级结构分析	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/

表 2 序列分析软件
Tab.2 Softwares employed in the sequence analyses

软件 software	来源 resources	功能 function
Bioedit 7.0	文献[7]	序列拼接、格式编辑、氨基酸组成及疏水性分析
MEGA 4.1	文献[8]	系统发育分析
MegAlign 5.0	DNASTAR Inc., Madison, USA	序列比对及同源性分析
Rasmol	http://www.openrasmol.org/	蛋白质三级结构

1.4 原核表达载体的构建

根据所获得的 *srp* 基因编码序列,设计特异引物(SSRP)并引入酶切位点,SSRP₁ 5'-CATGCCATGGAACCTCCCAACCAATCAA-3' (斜体部分为 *Nco* I 酶切位点);SSRP₂ 5'-CCGCTCGAGGACAGAGGACAAGTACTTG-3' (斜体部分为 *Xho* I 酶切位点)。

按上述方法提取海带雌、雄配子体总 RNA 以及合成 cDNA 第一链,以此为模板,用 SSRP 引物进行 PCR 扩增,以获得带有双酶切位点的 *srp* 基因序列。25 μ L PCR 反应体系包含 15.7 μ L 灭菌双蒸水,2.5 μ L PCR 缓冲液(TaKaRa 公司),1.5 μ L 的 Mg^{2+} (25 mmol/L),1 μ L SSRP₁ (10 μ mol/L),1 μ L SSRP₂ (10 μ mol/L),2 μ L 的 dNTPs (2.5 mmol/L),1 μ L cDNA 模板(约 1.5 ng)及 0.3 μ L 的 *rTaq* 酶(5 U/ μ L)。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,64 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 共进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将获得的条带利用试剂盒(TaKaRa 公司)进行回收,然后与克隆载体 pMD19-T (TaKaRa 公司)连接,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态(天根生化)中。在 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取单菌落,然后转移至 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养 8~12 h。通过菌落 PCR 验证阳性克隆,并将阳性克隆菌液送上海生物工程技术有限公司进行序列分析。

从经过验证的菌液中利用试剂盒(TaKaRa 公司)提取质粒,将提取的质粒和 pET28a 载体分别通过 *Nco* I 酶和 *Xho* I 酶(TaKaRa 公司)于 37 $^{\circ}$ C 进行 3.5 h 的酶切反应,回收酶切后的目的片段及 pET28a 载体,将两者通过 T₄ 连接酶(TaKaRa 公司)进行连接(目的片段:载体 = 10:1,16 $^{\circ}$ C 过夜)^[9]。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中培养。提取质粒进行 *Nco* I、*Xho* I 双酶切验证。将构建成功的表达重组质粒

送上海生物工程技术有限公司进行序列分析。

1.5 重组蛋白的表达

重组蛋白的诱导表达 将经过验证的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞(上海申能博彩公司)中,在含卡那霉素的 LB 培养基筛选和培养。在 LB 培养基中,按 1:100 的菌液与培养基的比例加入菌液进行扩大培养。当菌液的光密度值 OD₆₀₀ 达到 0.6 时^[9-11],加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行重组蛋白的表达诱导。为优化表达条件,诱导温度分别设为 37 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C^[12],IPTG 的终浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L^[10-12]。其中 37 $^{\circ}$ C 诱导培养于 1、2、3、4 h 分别收获细菌^[10-11],而 28 $^{\circ}$ C 诱导培养分别在 5 h 和 10 h 收获菌液,以观察重组蛋白的表达情况。

重组蛋白粗提液的制备 将离心收集的菌体用 PBS(含 0.137 mol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na₂HPO₄,2 mmol/L KH₂PO₄)悬浮,冰浴超声波破碎(200 V 电压,2 s 破碎,2 s 间隔共 30 次)。4 $^{\circ}$ C 下 12 000 \times g 离心 10 min,分别收集上清液和沉淀,沉淀用 PBS 悬浮。若重组蛋白以可溶性形式表达,则存在于上清液中,可直接用于下一步实验。若重组蛋白以包涵体形式表达,则存在于沉淀中,这时需用 9 倍体积的漂洗缓冲液(含 100 mmol/L NaH₂PO₄,2 mol/L 尿素,10 mmol/L Tris,0.5% Triton X-100,pH 8.0)^[11,13]重悬沉淀,4 $^{\circ}$ C 下 6 000 \times g 离心 15 min,重复漂洗两次,得到较纯的包涵体蛋白。用 8 mol/L 尿素缓冲液(含 100 mmol/L NaH₂PO₄,8 mol/L 尿素,10 mmol/L Tris,pH 8.0)^[13]4 $^{\circ}$ C 过夜溶解包涵体,然后 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 \times g 离心 15 min,取上清液,-20 $^{\circ}$ C 保存。

重组蛋白的凝胶电泳 使用 5% 浓缩胶及 12% 分离胶进行重组蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)电泳。上样量 20 μ L,上样前,将样品于 100 $^{\circ}$ C 煮 2 min。电泳时,浓缩胶电压 130 V,分离

胶电压 180 V。电泳结束后,考马斯亮蓝 R-250 染色 1.5 h,甲醇醋酸脱色法脱色过夜^[11]。

1.6 高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)分析表达蛋白

将重组蛋白用乙腈溶液复溶,再利用胰蛋白酶(Trypsin)酶解 20 h^[14],然后将高效液相色谱获得的酶解肽段分别进行质谱分析,最后通过 Agilent Quality Analyze 软件分析数据。

1.7 SRP 多克隆抗体的制备

SRP 多克隆抗体的制备 取纯化后的重组蛋白 500 μg 与等量弗氏完全佐剂(Sigma 公司)混合,充分乳化后采用背部多点注射法免疫家兔,两周后取 125 μg(首次剂量的 1/4)与等量弗氏不完全佐剂(Sigma 公司)混合法加强免疫,以后每 2 周免疫一次,共 4 次,末次免疫后 5~7 d 于家兔耳缘静脉取血,试血达理想效价(间接 ELISA 方法测定血清效价)后,颈动脉放血,收集兔血清,-20 °C 保存。

间接 ELISA 方法测定血清效价 ① 采用包被缓冲液将纯化的表达产物稀释成 20 μg/mL,作为包被抗原;② 吸取包被抗原到 96 孔板中(100 μL/孔),37 °C 水浴 1 h;③ 倒掉板中的液体,用 PBST(10 mmol/L PBS,140 mmol/L NaCl,0.1% Tween 20,pH 7.4)洗板 3 次,每次 3 min;④ 抗血清用 PBS 先稀释 2 500 倍,再行倍比稀释(即稀释梯度为 5 000、10 000、20 000、40 000、80 000 和 160 000 倍),每孔加样量为 100 μL,37 °C 水浴 1 h;⑤ 倒掉板中的液体,用 PBST 同法洗板;⑥ 将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 用 PBS 稀释 1 000 倍,每孔加样 100 μL,37 °C 水浴 1 h;⑦ 倒掉板中的液体,用 PBST 同法洗板;⑧ 加底物缓冲液(Pierce 公司),每孔加样 100 μL,显色 15~30 min,以 100 μL 终止液(Pierce 公司)终止反应,在酶标仪上测定波长 490 nm 下的 OD 值。

1.8 海带配子体总蛋白质的提取及 Western 印迹检测

酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法^[15-16]提取海带配子体蛋白质 ① 取鲜重 0.2 g 配子体于液氮研磨成粉末,溶于 500 μL 冷提取液[50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L KCl,1% (W/V) DTT,30% 甘油,pH 8.5]中。② 4 °C 下 12 000 × g 离心 15 min,收集上清液。③ 在上清液中加入 500 μL 冷 Tris 饱和酚(pH 8.0),4 °C 静置 1 h。④ 4 °C 下

9 000 × g 离心 5 min,收集酚相。⑤ 向酚相中加入 500 μL 冷提取液。⑥ 4 °C 下 9 000 × g 离心 5 min,收集酚相。⑦ 向酚相中加入 3 倍体积的含 100 mmol/L 醋酸铵的甲醇溶液,-20 °C 放置沉淀过夜。⑧ 4 °C 下 12 000 × g 离心 15 min,收集沉淀。⑨ 沉淀用适当体积的裂解液[1.5 mmol/L 尿素,0.1 mmol/L 3-(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基-1-丙磺酸(CHAPS)],使用前加 1 mol/L DTT 溶解。

Western 印迹检测 将蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后将蛋白质经电转移(200 mA 电流,1 h)从凝胶转移至硝酸纤维素膜(NC)上,用 TBST(0.137 mol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,0.025 mol/L Tris 和 0.05% Tween 20,pH 7.4)洗涤一次,然后用 5% 脱脂奶粉(5 g 脱脂奶粉,100 mL TBST)封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入适量的多克隆抗体,常温孵育 1 h 后同法洗膜。然后加入适量的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,室温温育 1 h 后同法洗膜。最后 ECL 显色法显色[A 液和 B 液(Pierce 公司)以 1:1 混合,加到膜上,然后暗盒曝光 1 min,最后显影、定影]。

2 结果与讨论

2.1 *srp* 基因的 cDNA 序列及氨基酸序列分析

利用 RACE 方法,经 PCR 扩增,分别获得长度为 371 bp 的 5'-末端和 722 bp 的 3'-末端产物,将它们与原雄配子体 cDNA 抑制消减文库中的克隆 b9 序列^[3] 拼接,并重新设计引物经过 PCR 扩增反应和测序验证,获得一条长 831 bp 的 cDNA 序列(GenBank 登录号:EF490313)。其中 5'-非翻译区(UTR)长 182 bp,3'-UTR 长 199 bp 且具有明显的 poly(A)尾巴,开放阅读框(ORF)长 450 bp,编码 149 个氨基酸。预测该编码蛋白的分子量为 17.2 ku,等电点为 10.46。

使用核苷酸序列同源搜索,无匹配。使用蛋白质序列同源搜索显示,推测该基因编码的氨基酸序列与点形念珠藻(*Nostoc punctiforme*)含 SpoIID/LytB 结构域蛋白(GenBank 登录号:YP-001867061)有 30% 相似性,后者主要在孢子形成过程中起作用^[17-18],因此我们将从海带配子体中克隆到的该基因拟命名为“孢子形成相关蛋白”基因。

根据雄配子体 *srp* 基因的 cDNA 序列设计引物,经过 PCR 扩增、克隆与测序,自海带雌配子体中得到预期大小为 831 bp 的目的条带 cDNA 序列,通过比对发现它与雄配子体 *srp* 基因相应部分的 cDNA 序列完全一致。根据 *srp* 基因的 cDNA 序列设计引物,自海带雌、雄配子体基因组中扩增其 DNA 序列,经序列分析可知该基因在 ORF 区域不存在内含子。这些结果说明 *srp* 基因同时存在于海带雌、雄配子体的细胞中,且在 cDNA 序列上没有差异。但在雌、雄配子体之间存在着差异表达^[3],我们认为这可能与该基因的拷贝数、转录本丰度以及细胞所处的生长发育阶段等不同因素有关,具体原因有待进一步分析。

利用生物信息学对 SRP 蛋白的结构和功能进行了预测(图 1)。组成 SRP 蛋白的氨基酸多为中性和碱性,且疏水性氨基酸(Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Pro)占 41.6%,说明具有较强的疏水性。疏水性氨基酸位于蛋白质内部,在维

持蛋白质稳定的三级结构中起着重要作用^[19]。经预测发现,SRP 蛋白无信号肽,但它具有 N-肉豆蔻酰基化、cAMP 与 cGMP 依赖型蛋白激酶磷酸化、蛋白激酶 C 磷酸化、酪蛋白激酶 II 磷酸化以及 N-糖基化等位点。一般来说,N-肉豆蔻酰基转移酶分布在细胞的不同位置并具有不同的生物学功能,主要是参与二级信号转导、囊泡转运等一些重要的生物学过程^[20]。蛋白激酶通过影响多种蛋白质底物磷酸化,参与细胞信号传递、控制细胞增殖与分化、调节基因表达等^[19];酪蛋白激酶 II 是真核细胞中普遍存在的一种既不受钙又不受 cAMP 调节的丝/苏氨酸蛋白激酶,其在细胞生存、发育、增殖过程中有很重要的功能^[19,21]。N-糖基化位点的作用是使蛋白质能够抵抗消化酶的作用,赋予蛋白质传导信号的功能,某些蛋白只有在糖基化之后才能正确折叠^[19]。关于该蛋白中各结构域的具体功能,有待于进一步研究。



图 1 推测的 SRP 蛋白及其功能域

Fig. 1 Predicted functional domain of the putative SRP

点形念珠藻等一些丝状蓝藻,在氮或磷等营养元素受限时,其末端或中间的营养细胞不经过减数分裂以及两个细胞的融合,可直接分化为异形胞或厚壁孢子^[22]。具有 SpoIID/LytB 结构域蛋白就是在其分化过程中起着重要的作用^[17-18]。海带配子囊是由丝状配子体末端营养细胞开始逐个发育而成^[2,23-24],这种方式非常类似于上述那些丝状蓝藻厚壁孢子或异形胞的产生。由此以及上述所预测的结构域功能,我们推测,本研究所克隆的孢子形成相关蛋白基因及其编码蛋白类似于它们在丝状蓝藻异形胞或厚壁孢子形成中的分子机理,参与海带配子囊的产生或配子的释放,但这有待于进一步来证实。

2.2 *srp* 基因表达载体的构建与诱导表达

将已构建的重组质粒 pET28a-*srp*,进行菌落 PCR 鉴定,可扩增出与目的片段大小一致的条带。然后将该重组质粒双酶切,发现阳性克隆中含有与预测基因大小一致的插入片段[酶切片段长度 479 bp,该片段包括引入的酶切位点(6 bp),*srp* 基因 447 bp 的 ORF(不含终止密码子)以及 ORF 区起始密码子(前 26 bp 的 UTR 区)]。重组质粒经测序,结果显示该插入片段与 *srp* 基因的 cDNA 序列完全一致,充分证明了 pET28a-*srp* 表达载体已成功地构建。

收集诱导表达后的菌体,进行超声波破碎。然后分别将其上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。结果发现,37 °C 和 28 °C 诱导的重组蛋白均以包涵体的形式表达,且在设计的 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 等 3 个浓度梯度实验中,当 IPTG 的终浓度为 1 mmol/L 时的表达量最高。

SDS-PAGE 电泳结果(图 2)显示,与空载质粒(不含目的片段的 pET28a 质粒)转化的大肠杆菌相比,携带 *srp* 基因重组质粒的大肠杆菌在大约 19.3 ku 处出现一条诱导表达的蛋白带,它与设计的重组蛋白分子量大小一致。与未用 IPTG 诱导的相比,重组蛋白表达量随诱导时间而增加,2 h 就能很好地诱导该基因的表达(图 2)。

2.3 高效液相色谱-质谱法检测表达蛋白序列

鉴于酶切位点的存在,我们在基因重组的分子设计时引入了几个非 SRP 蛋白序列的氨基酸残基,为了证实重组的蛋白确为 SRP 蛋白,选用了高效液相色谱-质谱串联(HPLC-MS)检测技术。

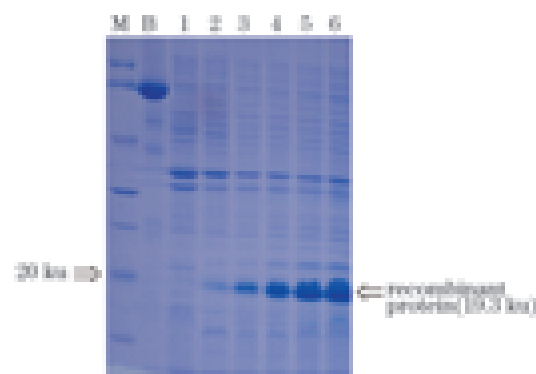


图 2 重组蛋白的表达图谱

M: 中分子量蛋白质标准(天根生物); B: 牛血清清蛋白; 泳道 1: 空载质粒对照; 泳道 2: 未诱导对照; 泳道 3~6: 分别为诱导表达 1、2、3 和 4 h。

Fig. 2 Expression profile of recombinant SRP in *E. coli*

M: Marker; B: bovine serum albumin; Lane 1: control without insertion of *srp* gene; Lane 2: control without induction by IPTG; Lanes from 3 to 6: expression of SRP induced by IPTG for 1 h, 2 h, 3 h and 4 h, respectively.

重组蛋白经 Trypsin 酶解后可以形成几个肽段。当采用 HPLC-MS 串联技术对重组表达蛋白进行分析时,其中 6 个肽段的序列分别为 YLSSVLHHH、YLSSVLHHHHH、GIAK、QWGE-ASWPTR、LVELVR 和 DFPGAIN,这些序列与推测的 SRP 蛋白酶解肽段的部分序列完全一致。其中 C 端的 13 个氨基酸序列为 C-HHHHHH-ELVSSLY-N,与表达载体构建时所设计的序列及 SRP 蛋白的氨基酸序列完全吻合,进一步说明了重组的蛋白即为目的蛋白。

2.4 海带配子体总蛋白的提取及 Western 印迹检测

取纯化后的重组蛋白免疫注射家兔,获得 SRP 蛋白的多克隆抗体,间接 ELISA 方法测定兔血清中该多克隆抗体的效价大于 1:80 000。通过对空载质粒以及重组质粒 pET28a-*srp* 转化的大肠杆菌进行 Western 印迹比较实验,发现制备的抗体可特异地与重组的 SRP 结合并显色,说明该抗体可用于后续的研究。

海带雌、雄配子体总蛋白电泳如图 3-A 所示。以重组蛋白制作的兔血清为一抗对配子体总蛋白进行 Western 印迹实验,结果显示,在基于 cDNA 预测的 SRP 蛋白分子量大小处(17.2 ku)检测到单一的蛋白质条带(图 3-B),说明该克隆的 *srp* 基因所编码蛋白确实存在于海带配子体细胞中,

以发挥相应的作用。有关 SRP 蛋白在海带配子体生长与发育过程所起的作用,有待于在自配子

体中分离 SRP 蛋白及性质分析的基础上,通过 RNAi 或基因敲除等手段来进一步探讨。

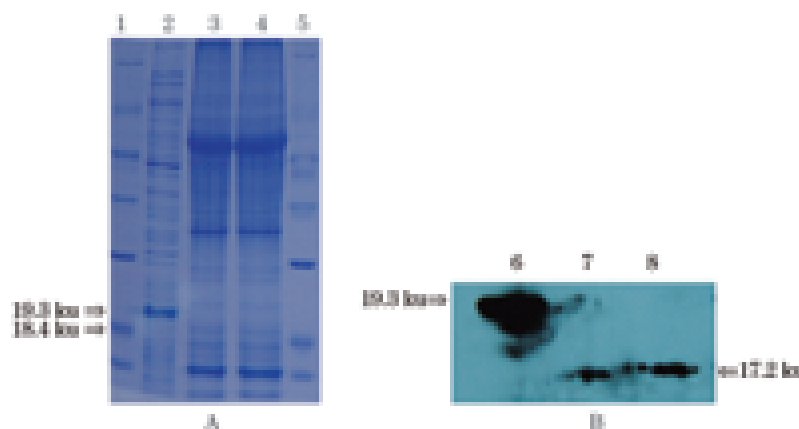


图3 海带配子体蛋白质电泳(A)及其 Western 印迹(B)图谱

泳道 1 和 5:中等分子量蛋白质标准(诺维森生物);泳道 2 和 6:重组蛋白质;泳道 3 和 7:雌配子体总蛋白;泳道 4 和 8:雄配子体总蛋白。

Fig. 3 Electrophoresis(A) and Western-blotting(B) profiles of the total proteins extracted from *L. japonica* gametophytes

Lanes 1 and 5:Marker of standard proteins; Lanes 2 and 6:the recombinant SRP protein; Lane 3 and 7:total proteins from the female gametophytes; Lanes 4 and 8:total proteins from the male gametophytes.

参考文献:

- [1] FAO. FAO yearbook. Fishery statistics aquaculture production[C]// Food and Agriculture Organization of the United Nations,Rome. 2006,98(2):1-199.
- [2] 吴超元,索如瑛.形态、生殖和生活史[M]//曾呈奎,吴超元(编著).海带养殖学.北京:科学出版社,1962:14-33.
- [3] 史西志,毕燕会,周志刚.海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选[J].水产学报,2005,29(5):666-669.
- [4] 陆广琴,欧阳珑玲,周志刚.海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库的生物信息学分析[J].中国水产科学,2009,16(2):221-229
- [5] 周志刚,吴超元.海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导[J].生物工程学报,1998,14(1):109-111.
- [6] Starr R C,Zeikus J A. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin[J]. Journal of Phycology,1993,29(suppl.):1-106.
- [7] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series,1999,41:95-98.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution,2007,24(2):1596-1599.
- [9] Cheng H T, Huang K C, Yu H Y, et al. A new protocol for high-yield purification of recombinant human CXCL8₍₃₋₇₂₎ K11R/G31P expressed in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification,2008,61:65-72.
- [10] Hao Y L,Huang X Y,Mei X H, et al. Expression, purification and characterization of pectin methylesterase inhibitor from kiwi fruit in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification,2008,60(2):221-224.
- [11] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2002: 1514-1540.
- [12] 廖美德,谢秋玲,林剑,等.外源基因在大肠杆菌中的高效表达[J].生命科学,2002,14(5):283-287.
- [13] 王广兰,宫璀璨,王文丽,等. sCRI 在原核中表达、纯化、复性及活性鉴定[J].实用医药杂志,2008,25(8):970-977.
- [14] 罗福文,陶定银,赵鹏,等.全二维微柱液相色谱-质谱鉴定人胃癌组织中的差异蛋白质[J].分析化学研究报告,2009,37(10):1403-1408.

- [15] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis [J]. *Proteomics*, 2005, 5(10): 2497 - 2507.
- [16] 刘伟霞, 潘映红. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的样品制备方法 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(10): 2169 - 2176.
- [17] Himes F R, Wedemeyer W J, Kroos L. Structure/function analysis of the *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription factor SpoIID [J]. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 2004, 104: 288 - 289.
- [18] Mcateer S, Coulson A, McLennan N, *et al.* The *lytB* gene of *Escherichia coli* is essential and specifies a product needed for isoprenoid biosynthesis [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (24): 7403 - 7407.
- [19] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 等. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 56 - 66, 425 - 428.
- [20] 盛春泉, 朱杰, 张万年, 等. N - 肉豆蔻酰基转移酶家族的进化踪迹分析研究 [J]. *药学学报*, 2007, 42(2): 157 - 165.
- [21] Pinna L A. Casein kinase 2: an ' eminence grise ' in cellular regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1954(3): 267 - 284.
- [22] Castenholz R W, Waterbury J B. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria [M] // Staley J T, Bryant M P, Pfennig N, *et al.*, (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989: 1710 - 1789.
- [23] Lüning K. Egg release in gametophytes of *Laminaria saccharina*: induction by darkness and inhibition by blue light and u. v [J]. *British Phycological Journal*, 1981, 16(4): 379 - 393.
- [24] Maier I, Müller D G. Antheridium fine structure and spermatozoid release in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) [J]. *Phycologia*, 1982, 21(1): 1 - 8.

Cloning of *srp* gene from the gametophytes of *Laminaria japonica* and its expression in *Escherichia coli*

CHEN Jing¹, WANG Li-li¹, SHI Wei-wei¹, ZHOU Zhi-gang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A male differentially expressed cDNA library subtracted from the female gametophytes of *Laminaria japonica* was constructed by use of suppression subtractive hybridization (SSH). A clone b9 was found to be a new differentially expressed gene using Southern dot-blotting. With the designed gene-specific primers on basis of Clone b9 sequence, a full length of cDNA was cloned by use of rapid amplification of cDNA ends (RACE). This gene was composed of 831 bp in sequence including a 182 bp 5'-untranslated region (UTR), a 199 bp 3'-UTR with a poly(A) tail, and a 450 bp open reading frame (ORF). There was no difference in sequence of this gene no matter where it was cloned from the females or the males. Protein homology searching result showed that it was homologous to *Nostoc punctiforme* SpoIID/LytB domain-containing protein (sporulation resulting in the formation of spores) with 30% similarity. This gene, therefore, was named sporulation-related protein gene (*srp*) (GenBank accession No. EF490313). The *srp* gene was ligated into pET-28a expression vector and was consequentially transformed into *Escherichia coli* BL21 competent cells. A recombinant protein was successfully expressed in prokaryotic cells with molecular weight of about 19.3 ku, and its expression was positively related to the content of inducer IPTG. Mass spectrometry analysis verified that the sequence of expressed recombinant protein was the same as the putative one on the basis of *srp* gene ORF sequence. The recombinant protein was purified from the transformed *E. coli* and its polyclonal antibody was obtained by inoculating immunologically rabbits. The SRP protein was proved to be present in the crude extracts from both the female and male gametophytes of *L. japonica* by using Western blot with the preparative antibody. The results lay a foundation for the further study on the isolation and characterization of SRP protein from gametophytes and on the investigation of function of SRP protein during the growth and development of *L. japonica* gametophytes.

Key words: *Laminaria japonica*; gametophytes; *srp* gene; prokaryotic expression; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn