

刺参甘露糖结合凝集素的原核表达、纯化及生物活性分析

李丹彤^{1,2*}, 谢广成^{1,2}, 丁文勇³, 王秀利^{1,2},
刘洋^{1,2}, 徐文琦^{1,2}, 张永攀^{1,2}

(1. 大连海洋大学农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学辽宁省海洋生物资源与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023;

3. 大连医科大学生物化学教研室, 辽宁 大连 116044)

摘要:为进一步研究刺参甘露糖结合凝集素(AJ-MBL)的功能及提高刺参自身免疫力,对AJ-MBL基因的CDS区进行原核表达、纯化并初步鉴定其生物学活性。采用RT-PCR法扩增AJ-MBL基因编码区,经酶切鉴定、序列分析后,将其CDS区498 bp片段克隆至原核表达载体pET28a中,得到重组质粒pET-AJ-MBL。重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞并经IPTG诱导表达出分子量约17 ku的融合蛋白。该蛋白以包涵体形式存在,用Ni²⁺离子亲和柱纯化。结果显示,获得高表达量的重组纯化蛋白。纯化的17 ku AJ-MBL进行红细胞凝集试验检测其生物学活性。凝集试验结果显示,AJ-MBL凝集最小浓度为10 μg/mL。本实验成功构建了AJ-MBL原核表达质粒,并在大肠杆菌中高效表达了17 ku AJ-MBL蛋白,该蛋白具有良好的生物学活性。

关键词:刺参;甘露糖结合凝集素;原核表达;蛋白纯化;红细胞凝集试验

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

免疫系统的进化经历了4亿年的历程,可分为固有免疫系统和适应性免疫系统。前者存在于所有动物种属,后者只见于鸟类以上的脊椎动物^[1]。刺参(*Apostichopus japonicus*)为棘皮动物,而棘皮动物是高等的无脊椎动物,又是最原始的后口动物。它起源于寒武纪之前,位于无脊椎动物与脊椎动物开始分支的进化阶段^[2]。棘皮动物与其它无脊椎动物一样具有先天性免疫系统。补体是固有免疫系统最为重要的体液分子^[1],凝集素补体途径是激活补体系统的3条途径之一,甘露糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)是凝集素补体途径的启动者^[5]。

MBL是一种大型糖蛋白,由9~18个相同的肽链组成,每条肽链均包含4个结构域:N-端富含胱氨酸区(cysteine-rich regions)、胶原样区(CLD)、颈区(neck region)和糖识别区

(CRD)^[3-6]。CRD区是MBL分子的识别功能区。LILLEGARD等^[7]发现,MBL能够增加小鼠抗血行传播散性念珠菌病的能力。MBL在病毒感染和免疫清除中起着重要作用^[8]。MBL的分子遗传学特点与感染和自身免疫性疾病发病有着密切联系^[9]。此外,凝集素在无脊椎动物的免疫识别中担当重要角色^[10-12]。

越来越多的研究表明,凝集素可以作为一种新型绿色水产动物免疫增强剂,能够提高水产动物免疫相关酶活性,增强机体免疫功能。条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)及孔石莼(*Ulva pertusa*)凝集素可以作为一种免疫添加剂激活鲫、鲤免疫系统,对鲫、鲤的非特异性免疫功能具有明显的增强作用^[13-14]。用含有裙带菜和萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)凝集素的饵料投喂刺参,可以显著提

收稿日期:2011-01-05 修回日期:2011-05-21

资助项目:辽宁省教育厅团队项目(2008T021)

通讯作者:李丹彤, E-mail: lidantong@dlou.edu.cn

高刺参免疫酶活性^[15]。

本研究从体外扩增、克隆刺参甘露糖结合凝集素核苷酸序列,构建重组原核表达质粒,诱导表达 AJ-MBL 蛋白并纯化,红细胞凝集试验检测 AJ-MBL 的生物学活性,旨在研究刺参甘露糖结合凝集素在刺参免疫中的作用,为刺参的疾病防治寻求新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

pET28a(+) (Novagen) 为大连海洋大学生命科学与技术学院王秀利教授惠赠;DH5 α 菌株、pMD-18T 载体、Dnase I、RNase A、T₄ DNA 连接酶、EcoR I、Nde I、DL2000 DNA Marker、IPTG、蛋白质低分子量 Marker、Total RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒均购自 TaKaRa 公司;Ni-NTA His 亲和层析介质和纯化柱为 Novagen 公司产品;溶菌酶、卡那霉素、咪唑、透析袋(MD34)购自 Solarbio 公司。

1.2 方法

目的基因 AJ-MBL 的 PCR 扩增及克隆 根据 NCBI 上 GeneBank 数据库公布的刺参甘露糖结合凝集素 mRNA 全序列,利用 Signal P 3.0 server 进行信号肽预测,在 CDS 区设计如下引物:AJ-MBL-F 5'-TATACATATGTGTCTGACGGCTTGTCGGAG-TTTTG-3'; AJ-MBL-R 5'-TAGAATTCCTACTCC-AAATGATACTCGATACAGG-3'(引物下划线部分分别为 Nde I 和 EcoR I 酶切位点)。通过逆转录反应合成 cDNA 的第一条链,随机引物、总 RNA 及 ddH₂O 混合后,65 °C 变性 5 min,4 °C 退火,然后进行 PCR 扩增。扩增条件:94 °C 预变性 1 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用胶回收试剂盒回收纯化。回收产物与 pMD-18T 载体按一定比例连接、转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌,挑选白色菌落进行摇菌,用质粒纯化试剂盒进行质粒提取并送交 TaKaRa 公司测序鉴定,获得重组质粒 pMD-18T-AJ-MBL。

重组表达载体的构建 分别以 Nde I 和 EcoR I 双酶切重组质粒 pMD-18T-MBL 和 pET28a(+) 表达载体,然后经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段和载体片段。将其按一定比例用 T₄

DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜,重组质粒转化感受态细菌 DH5 α ,转化后的菌液涂布含卡那霉素(Kan+)的 LB 培养皿上,倒置培养过夜后挑选阳性菌落至 Kan+ 的 LB 培养液中,过夜摇菌提取质粒并送交 TaKaRa 公司测序鉴定,获得重组表达载体 pET-AJ-MBL。

AJ-MBL 的诱导表达 将获得的重组表达载体 pET-AJ-MBL 转入表达宿主菌株 BL21(DE3)中,选取具有较高表达量的菌株接种到 10 mL LB(Kan+, 50 μ g/mL) 培养液中,培养过夜。再从过夜培养物中各取 500 μ L 接种到 10 mL LB(Kan+, 50 μ g/mL) 培养液,37 °C 剧烈振荡至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.7。将菌液分成 6 份,一份不加 IPTG,其余 5 份加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L。37 °C 继续振荡培养,分别于 1、2、3、4、6 h 各取菌液 2 mL,离心收集菌体进行 12% SDS-PAGE 电泳,观察不同诱导时间对目的蛋白表达量的影响。

用上述方法诱导培养 50 mL 菌液,6 h 后离心收集菌体,将菌体重悬于 5 mL 裂解缓冲液中(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑,pH 8.0,用时加溶菌酶至终浓度 1 mg/mL),冰浴 30 min,进行超声破碎,离心后分别收集上清液(包含可溶性蛋白)(样品 A)和沉淀(包含不溶性蛋白)(样品 B)。样品 B 用 5 mL Wash Buffer 1(0.5 mol/L NaCl,2% Triton-100)洗涤 2 次,Wash Buffer 2(0.5 mol/L NaCl)洗涤 1 次,并用去离子水洗涤两次(样品 C)。分别取样品 A、B、C 进行 12% SDS-PAGE 电泳检测。

AJ-MBL 重组蛋白的纯化 按上述方法进行诱导培养,离心收集菌体,将沉淀按每克湿重加入 2~5 mL 裂解缓冲液的比例重悬于裂解缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tis-Cl, 8 mol/L Urea,pH 8.0);再加入溶菌酶(终浓度 1 mg/mL),冰浴 30 min。超声破碎,再加入 Rnase A(10 μ g/mL)和 DNase I(5 μ g/mL),冰浴 15 min,离心收集上清液。取 4 mL 上清液和 1 mL 50% Ni-NTA 悬浮液混合,4 °C 轻微摇动 1 h,进行装柱和柱层析,收集层析液(溶液 A)。用 200 μ L 洗涤缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tis-Cl, 8 mol/L Urea,pH 6.3)洗柱 2 次(溶液 B 和 C),洗脱蛋白用洗脱缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tis-Cl, 8 mol/L Urea,pH 4.5)洗涤 2 次,收集洗脱液(溶液 D 和 E)。洗脱

液中具有纯化的融合蛋白。

AJ-MBL 重组蛋白生物学活性分析 将含有重组蛋白的各管流出液合并,然后装进透析袋中透析,脱盐,复性和反透析。根据文献[16-17],利用红细胞凝集实验对纯化的 AJ-MBL 进行生物学活性分析。实验分 3 组,即生理盐水阴性对照、伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 阳性对照和待测样品。采集兔耳缘静脉血,制成 2% 红细胞悬浮液。取 96 孔 V 型凝集板,每孔分别加入 50 μL 生理盐水、倍比稀释的蛋白样品和 ConA,最后分别加入兔红细胞悬液 50 μL 。室温孵育 2 h。观察红细胞的沉淀状态以检测目的蛋白的生物学活性。

2 结果

2.1 AJ-MBL 基因的扩增与克隆

用 RT-PCR 方法扩增得到 AJ-MBL 基因 CDS 区,PCR 产物经琼脂糖电泳检测,获得非常特异的目的条带,大小约为 500 bp,与预期相符(图 1)。将其连入 pMD-18T 载体,得到重组质粒,经酶切鉴定(图 2)和测序分析,测序结果详见文献[18],与 GenBank 中的序列 (AY625513) 一致。

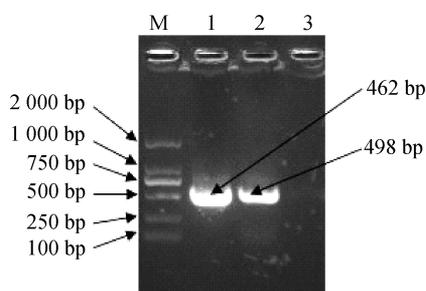


图 1 AJ-MBL 基因扩增产物

M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照 (pSPTet3 质粒); 2. AJ-MBL; 3. 阴性对照。

Fig. 1 RT-PCR amplification of AJ-MBL

M. DL2000 Marker; 1. positive control (pSPTet3); 2. AJ-MBL; 3. negative control.

2.2 重组表达质粒 pET-AJ-MBL 的构建与鉴定

利用 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pMD-18T-AJ-MBL 和表达载体 pET28a(+),回收酶切产物,将目的片段连入 pET28a(+),连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌,经 PCR 鉴定挑选阳性克隆进行测序鉴定,结果与 GenBank 中公布的序列一致。

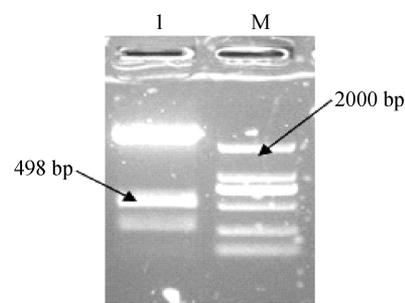


图 2 pMD-18T-AJ-MBL 双酶切鉴定

1. AJ-MBL 基因; M. DL2000 Marker。

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD-18T-AJ-MBL by restriction digestion

1. AJ-MBL gene; M. DL2000 Marker.

2.3 AJ-MBL 的诱导表达和表达特性分析

将构建好的重组质粒 pET-AJ-MBL 转化 BL21(DE3) 表达宿主菌,用 IPTG 诱导,在 1、2、3、4、6 h 收集菌体进行不同时间对蛋白诱导表达量的影响的检测,电泳结果显示,诱导 2 h 后即可见在约 17 ku 处出现重组蛋白的特异性条带,诱导 6 h 达最大量(图 3)。

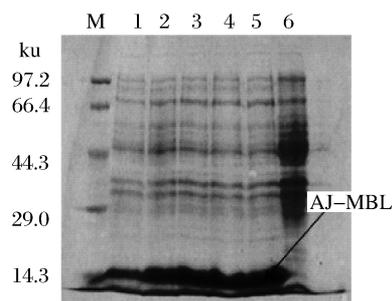


图 3 融合蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

M. 低分子量蛋白 Marker; 1~5. IPTG 诱导 1、2、3、4、6 h; 6. 无 IPTG 诱导。

Fig. 3 Accumulation of recombinant AJ-MBL in *E. coli* strain BL21 (DE3)

M. Protein low molecular mass markers; Lane 1 - 5. samples collected after induction by IPTG for 1, 2, 3, 4 and 6 h respectively; Lane 6. sample collected before induction by IPTG; The arrowhead shows the protein of recombinant AJ-MBL.

将构建好的重组质粒 pET-AJ-MBL 转化 BL21 (DE3) 表达宿主菌,用 IPTG 诱导 6 h,用溶菌酶处理后进行超声破碎,分别收集上清液(样品 A)和沉淀(样品 B),对样品 B 进行洗涤,得到样品 C,电泳检测表达特性。结果显示,重组蛋白表达较好,且

表达的蛋白以包涵体形式存在(图4)。

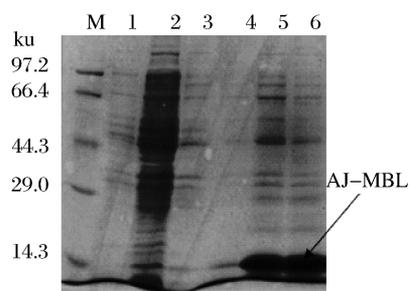


图4 大肠杆菌表达的 AJ-MBL 的性质分析

M. 低分子量蛋白 Marker; 1~3. 无 IPTG 诱导的样品 A1、B1、C1; 4~6. IPTG 诱导的样品 A2、B2、C2。

Fig. 4 Determination of the recombination protein solubility

M. Protein low molecular mass markers; Lane 1-3. the samples of soluble protein fraction (sample A1), insoluble protein fraction (sample B1) and inclusion bodied (sample C1) showed no induction by IPTG respectively; Lane 4-6. the samples A2, B2, C2 induction by IPTG respectively; The arrowhead shows the protein of recombinant AJ-MBL.

2.4 AJ-MBL 重组蛋白的纯化

由于表达的重组蛋白在 C 端带有 6 个组氨酸标签,选择 Ni-NTA 亲和层析介质对目的蛋白进行纯化,得到纯化的融合蛋白(图5)。

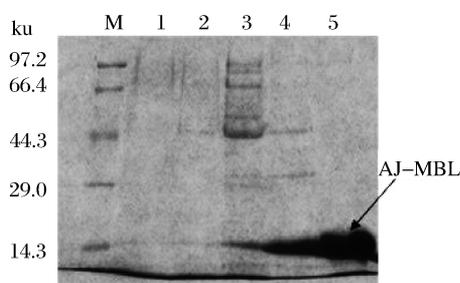


图5 大肠杆菌表达的 AJ-MBL 的纯化分析

M. 低分子量蛋白 Marker; 1. 溶液 A; 2,3. 溶液 B 和 C; 4,5. 溶液 D 和 E。

Fig. 5 Purification of the recombination protein of AJ-MBL

M. Protein low molecular mass markers; Lane 1. the sample of flow-through (solution A); Lanes 2,3. the samples of first and second washes (solution B and C) respectively; Lane 4,5. the samples of first and second elutes (solution D and E) respectively; The arrowhead shows the protein of recombinant AJ-MBL.

2.5 AJ-MBL 重组蛋白生物学活性分析

洗脱得到的 AJ-MBL 重组蛋白在蒸馏水中透析,除去尿素,之后在生理盐水反透析,以使变性

的蛋白复性。调整 AJ-MBL 的初始质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经过倍比稀释后进行凝血活性测定,结果显示,当重组的 AJ-MBL 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时,具有凝集兔红血细胞的能力(图6)。说明得到的 AJ-MBL 具有生物学活性。

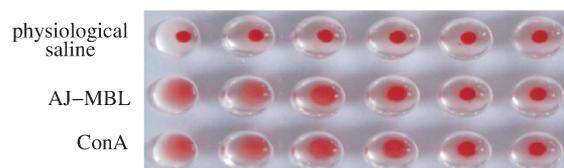


图6 重组 AJ-MBL 生物活性分析

阴性对照. 生理盐水; AJ-MBL 质量浓度从左至右依次为 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 阳性对照. ConA 质量浓度, 从左至右依次为 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Fig. 6 Hemagglutination assay of recombinant AJ-MBL

Negative control. 0.9% NaCl solution; AJ-MBL concentration: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from left to right; Positive control ConA. 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from left to right.

3 讨论

固有免疫作用迅速,防御机制多样,但缺乏免疫记忆。固有免疫系统中绝大多数效应细胞上有结构识别受体,通过识别大多数微生物中高度保守的分子结构后启动固有免疫。其中,分泌型结构受体中最具特点的是 MBL,可特异性结合微生物表面的甘露糖残基和(或)N-乙酰葡萄糖胺(N-GlcNAc)为末端糖基的糖蛋白,不依赖于抗体启动调理作用或补体活化级联反应,来保护自身和维护生理平衡^[3]。MBL 的 4 个结构域中,CRD 结合甘露糖残基或 N-GlcNAc,胶原样区通过构象改变激活 MASPI-MASP2,进而活化 C2、C4,形成 C3 转化酶(C4b2a),激活补体系统^[15]。另有研究显示,MBL 也可不依赖补体行调理作用,调控炎症反应和促进凋亡^[20]。

采用大肠埃希菌表达真核基因,表达效率高,容易操作,周期短,因此是目前重组蛋白体外表达常用的表达系统。特别是 Novagen 公司开发的 pET 表达载体及 BL21 系列菌株最为普遍。BL21 (DE3) 菌株的染色体中整合了 T₇ RNA 聚合酶基因,能表达 T₇ RNA 聚合酶,在 IPTG 的诱导可以启动,启动 T₇ 启动子的 pET 表达载体转录外源基因,从而表达外源蛋白^[21]。本研究选用的 pET 表达载体 C 端有编码 6 个组氨酸标签的序列

(6 × His Tag),不仅可以用来鉴定重组蛋白,还可利用组氨酸残基与 Ni-NTA 层析介质 Ni²⁺ 结合的特点,使表达的重组蛋白得以分离、洗脱和纯化。对不同诱导时间表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 检测,在约 17 ku 处出现预期蛋白条带,且不同时间的蛋白条带亮度不同,而未诱导的阴性对照不出现该位置的蛋白条带,说明该处的蛋白是目的蛋白且重组蛋白的表达量具有时间依赖性,诱导 6 h 达最大量。经表达特性分析,显示 AJ-MBL 以包涵体的形式存在,包涵体被尿素裂解后,AJ-MBL 成为可溶解的蛋白。在变性条件下,通过亲和层析可纯化得到较高浓度的 AJ-MBL。通过电泳检测,确定纯化得到的蛋白是重组的 AJ-MBL。红细胞凝集试验证实纯化的重组蛋白 AJ-MBL 经透析复性后具有凝集兔红细胞的活性。

我国的刺参养殖已具规模,辽宁、山东是养殖的主要地区。但在刺参养殖中,常伴有各种病害发生,给我国刺参养殖业造成巨大损失。其中,育苗阶段的海参烂边病和海参化板症等病害比较常见^[22]。刺参只具有固有免疫系统,而 MBL 能识别外来物通过凝集素途径激活补体系统。补体作为免疫分子,具有补体介导的细胞溶解、调理作用、引起炎症反应、清除免疫复合物、免疫调节和补体与其它酶系统的相互作用的生物学功能。关于刺参甘露糖结合凝集素序列分析^[18]和生物信息学分析^[23]均已完成,因此,熊川男等^[24]提出的凝集素可以作为海参免疫增强剂,在人工养殖海参中应用的建议是可行的。MBL 在认识 and 解决集约化、半集约化的养殖生物防病治病中具有重要作用^[25]。

参考文献:

- [1] 高晓明. 免疫学教程[M]. 北京:高等教育出版社, 2006:7-11.
- [2] 孟繁伊,麦康森,马洪明,等. 棘皮动物免疫学研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(7): 803-809.
- [3] 顾圆圆,夏正坤. 甘露糖结合凝集素的研究进展[J]. 医学研究生学报,2008,21(5):537-541.
- [4] 吴蔚,陶然,尚世强. 甘露糖结合凝集素研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2009,29(12): 1148-1152.
- [5] TAYLOR M E, BRIEKELL P M, CRAIG R K, et al. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein [J]. Biochemical Journal,1989,262(3):763-771.
- [6] PRESANIS J S, KOJIMA M, SIRE R B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL) [J]. Biochemical Society Transactions, 2003,31(Pt4):748-752.
- [7] LILLEGARD J B, SIRE R B, THORKILDSON P, et al. Recognition of candida albicans by mannan-binding lectin *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal Infectious Diseases,2006,193(11):1589-1597.
- [8] 李怡,张令强,贺福初. 病毒感染和免疫清除中的 C 型凝集素 [J]. 生命的化学,2005,25(4): 281-284.
- [9] 康闽,王宏伟. 甘露糖结合凝集素与感染免疫性疾病 [J]. 实用儿科临床杂志,2005,20(6): 592-593.
- [11] 徐海圣,徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展 [J]. 大连水产学院学报,2001,16(1): 49-56.
- [11] 余燕泽,石安静. 贝类血细胞研究进展 [J]. 动物学杂志,1998,33(5):40-41.
- [12] 柯佳颖,陈寅山,饶小珍. 凝集素及其生物学作用 [J]. 宁德师专学报:自然科学版,2005,17(1): 19-22.
- [13] 李丹彤,袁美云,林春江,等. 不同海藻凝集素对鲤免疫活性物的诱导 [J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版,2006,29(3):348-351.
- [14] 李丹彤,吕景才,邢殿楼,等. 孔石莼和条斑紫菜凝集素对鲫鱼免疫活性物的诱导作用 [J]. 信阳师范学院:自然科学版,2007,20(3):309-312.
- [15] 李丹彤,谢广成,李洪福,等. 裙带菜和萱藻凝集素对刺参组织主要免疫酶活性的影响 [J]. 水产学报,2011,35(4):524-530.
- [16] 张朝燕,蓝闽波,戴亚娟. 20 种抗菌中药的凝集活性研究 [J]. 时珍国医国药,2009,20(12): 2972-2973.
- [17] 易绍琼,任声权,于婷,等. 半乳糖凝集素-1 的表达纯化与生物活性分析 [J]. 军事医学科学院院刊,2009,33(3):231-233.
- [18] 谢广成,李丹彤,丁文勇,等. 大连刺参体腔液甘露糖结合凝集素序列的鉴定及分析 [J]. 河北渔业, 2011(1):5-8,24.
- [19] MEDZBITOV R, JANEWAY C. Innate immunity [J]. N Engl J Med,2000,343(5):338-344.
- [20] TURNER M W. The role of mannose-binding lectin in health and disease [J]. HK J Paediatr,2002,7(3): 134-142.
- [21] 李学军,宋善俊,李永敢,等. 人 fg12 凝血酶原酶 FRED 结构域的原核表达、纯化及其凝血活性的鉴

- 定[J]. 华中科技大学学报:医学版,2009,38(5): 660-663.
- [22] 王颖,仇雪梅,王娟,等. 刺参病害现状及其生物技术检测的研究进展[J]. 生物技术通报,2009,(11):60-64.
- [23] 谢广成,李丹彤,周立敬. 刺参甘露糖结合凝集素的生物信息学分析[J]. 生物技术通报,2011,2: 136-140.
- [24] 熊川男,李伟,白雪芳,等. 凝集素作为海参免疫增强剂在人工养殖海参中的应用[J]. 饲料工业,2005,26(18):30-32.
- [25] 赵寅生. 凝集素生物学功能及应用[J]. 安徽农业大学学报,2001,28(4):445-447.

Prokaryotic expression, purification and bioactivity analysis of *Apostichopus japonicus* mannan-binding lectin

LI Dan-tong^{1,2*}, XIE Guang-cheng^{1,2}, DING Wen-yong³, WANG Xiu-li^{1,2},
LIU Yang^{1,2}, XU Wen-qi^{1,2}, ZHANG Yong-pan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Mariculture Certificated by Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Marine Bio-resource Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. Biochemistry Teaching and Research Division, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: To further study the functional characteristics of *Apostichopus japonicus* mannan-binding lectin (AJ-MBL) and to improve the natural immunity of *A. japonicus*, a prokaryotic vector of AJ-MBL gene CDS region was constructed. The fusion protein was expressed and purified in prokaryotic system and its bioactivity was studied. The coding sequence of AJ-MBL was amplified by RT-PCR method. After being identified by the restriction digestion and sequencing, the 498 bp of AJ-MBL gene was inserted into pET28a plasmid to yield an identified recombinant plasmid pET-AJ-MBL, which was used to transform the competent expressive cells of *E. coli* BL21 (DE3). After induction with IPTG, samples analysis results revealed that a fusion protein of approximately 17 ku was yielded, and it occurred in the form of inclusion bodies, and could be purified with Ni²⁺ affinity chromatography. The results showed highly expressed fusion protein was acquired. The purified 17-ku AJ-MBL underwent hemagglutination assay to test its bioactivity, the results showed that the minimum hemagglutination concentration was 10 μg/mL. These results indicated that the CDS domain of AJ-MBL had high expressed and the fusion protein (17 ku AJ-MBL) was highly bioactivity.

Key words: *Apostichopus japonicus*; mannan-binding lectin; prokaryotic expression; purification; hemagglutination assay

Corresponding author: LI Dan-tong. E-mail: lidantong@dlou.edu.cn