

## 罗非鱼 HSP70 (tHSP70) 蛋白的生物信息学分析、 真核表达及质谱鉴定

罗洪林<sup>1</sup>, 张瑶瑶<sup>2</sup>, 梁万文<sup>1</sup>, 陈福艳<sup>1</sup>, 李旻<sup>1</sup>, 甘西<sup>1\*</sup>

(1. 广西水产科学研究院, 广西南宁 530021;  
2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005)

**摘要:** 运用生物信息学技术分析罗非鱼热休克蛋白 70 (tilapia heat shock protein, tHSP70) 的理化特性、糖基化位点、跨膜区域、蛋白的细胞定位及信号肽与虹鳟等其他动物 HSP70 的相似性, 以人工合成 cDNA 为模板, 通过聚合酶链式反应扩增其完整 CDS, 并将此 DNA 片段与真核表达载体 pGAPZa-A 连接, 构建 pGAPZa-HSP70 表达质粒, 在毕赤酵母 GS115 中表达 tHSP70 蛋白, 对表达上清液进行 SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析后, 采用 Ni<sup>2+</sup> IDA 层析脱盐纯化目的蛋白, 并对所表达的蛋白进行糖基化 PAS 染色鉴定。对表达的蛋白进行 SDS-PAGE 后, 将所获得的非预定大小 (约 100 ku) 条带进行电离飞行时间质谱鉴定, 并确定其蛋白种类。结果表明: tHSP70 所含氨基酸数量为 640, 分子量为 70 274.5 u, 等电点为 5.49。在哺乳动物网织红细胞 (体外) 的半衰期为 30 h, 在酵母内半衰期大于 20 h, 而在大肠杆菌内的半衰期也大于 10 h, 不稳定指数为 36.64, 脂肪族指数为 85.58。可能分别含有 6 个 N-和 O-糖基化位点, 所克隆 tHSP70 基因与目的基因完整编码区序列完全一致, 所构建的 pGAPZa-HSP70 质粒能在 GS115 中成功表达, 诱导表达上清液经 SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析后发现, 除 70 ku 目的蛋白外, 还出现一条 100 ku 条带。经糖基化 PAS 染色证明, 此 100 ku 蛋白可能是 HSP70 糖基化的结果, 且能被人的兔抗 HSP70 抗体识别, 质谱鉴定证明该条带即是 tHSP70 蛋白。本研究所表达 tHSP70 蛋白为后续罗非鱼细胞学及抗原提呈等免疫学研究奠定了基础。

**关键词:** 罗非鱼热休克蛋白 70; 真核表达; 糖基化; 质谱鉴定

**中图分类号:** Q 785; S 965

**文献标志码:** A

鱼类热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 在各种应激条件下表达的变化及其在免疫系统中的作用是目前鱼类免疫学研究的热点。越来越多的研究表明, 从细菌、哺乳动物、人和利用生物工程技术生产纯化的 HSP 均具有潜在的刺激机体产生免疫反应的功能<sup>[1-9]</sup>。例如, HSP 能刺激自然杀伤细胞产生细胞溶解活性, 也能刺激巨噬细胞和树突状细胞产生大量一氧化氮和趋化因子<sup>[10-11]</sup>。另外, 作为热休克蛋白家族中研究较多的 HSP70 可增强抗原特异性 CD4<sup>+</sup> 和

CD8<sup>+</sup> T 细胞反应, 这是因为与 HSP70 蛋白结合的抗原肽能被 HSP70 通过刺激巨噬细胞或树突状细胞上的能与 HSP70 结合的受体 (如 CD91, LOX-1) 高效摄取而发挥作用<sup>[12-13]</sup>。据此推测, HSP70 可能在提高抗原呈递细胞的抗原呈递能力上发挥重要作用。已有研究表明, HSP70 作为分子伴侣与肿瘤细胞中的内源性多肽结合, 经细胞免疫途径增强其抗肿瘤效应, 所制备的 HSP70-肽肿瘤疫苗的抗肿瘤作用已经在实验动物上得到证实<sup>[14-15]</sup>。已对多种鱼 HSP70 基因

收稿日期: 2014-10-29 修回日期: 2015-01-05

资助项目: 国家自然科学基金面上项目 (31372553); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49); 广西八桂学者建设工程专项

通信作者: 甘西, E-mail: ganxien@126.com

和蛋白的克隆、表达及鉴定开展相关研究,例如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[16]</sup>、青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[17]</sup>、斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[18]</sup>、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)<sup>[19]</sup>、罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)<sup>[20]</sup>、Tinea creek<sup>[21]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[22]</sup>、Australasian snapper<sup>[23]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[24]</sup>和剑尾鱼 (*Xiphophorus hellri*)<sup>[25]</sup>等。然而,这些鱼类的 HSP70 主要在原核表达系统中表达,且主要研究热应激条件下鱼体组织中 HSP70 基因的表达情况,并未对纯化鉴定后的 HSP70 蛋白的生物学功能进行深入研究,更未对 HSP70 的免疫学特性进行深层次探索。对 HSP70 如何刺激机体免疫反应、增强免疫细胞提呈抗原能力的研究目前仍罕见报道。对其进行详细研究的前提是获得具有生物活性的纯化 HSP70 蛋白,并对其基本特性进行研究。本实验利用酵母真核表达系统体外表达 HSP70,对其进行纯化和质谱鉴定,为后续免疫学研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

表达载体 pGAPZa-A 和菌株 GS115 酵母菌株购自 Life Science 公司(中国);高保真 pfu 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA Ligase、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 购自 NEB 公司(中国);DNA 胶纯化试剂盒和质粒小提试剂盒购自 Axygen 公司(中国);0.22 μm 无菌滤器和透析袋购自 Millipore 公司(中国);Ni<sup>2+</sup> IDA 亲和层析胶购于 Ubio 公司(中国);小鼠原性抗 His-tag 单克隆抗体和兔抗鼠 HRP 二抗由北京英茂盛业生物科技有限公司提供;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司(中国);X 光片购自美国柯达公司;ECL 显色液购自中国普利莱公司;蛋白标准分子量和 EASYsee-Western Marker 购自中国全式金公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自威格拉斯公司(中国);Tyrptone、Yeast Extract 购自 OXOID 公司(德国);YPD 培养基、10 × YNB 培养基、0.02% 生物素、10 × D 培养基(20% 葡萄糖)、10 × M 培养基(5% 甲醇)、10 × GY 培养基(10% 甘油)、1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)、1 mol/L 山梨醇、MD 培养基、BMGY 和 BMMY 培养基均为国产分析纯配置;

引物和 HSP70DNA 全长序列由北京中美泰和公司合成。

### 1.2 实验方法

罗非鱼 HSP70 蛋白的生物信息学分析  
下载 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中罗非鱼 HSP70 基因(FJ213839.1)及蛋白(ACI42865.1)序列,采用 ProtPara (<http://web.expasy.org/protparam/>)程序对罗非鱼 HSP70 蛋白序列的基本理化特性进行分析,并采用 NetNGlyc 1.0 Server 及 NetOGlyc 4.0 Server (<http://web.expasy.org/tools>)对蛋白质可能出现的糖基化位点进行预测。运用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)预测蛋白的亲水性和疏水性。利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行跨膜区预测。利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测;PSORT II prediction (<http://psort.hgc.jp/form2.htmlInput>)进行亚细胞定位预测;在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载人、鼠及其他水生动物 HSP70 蛋白序列后运用 DNASTar 软件进行 MegAlign 比对。

引物设计、PCR 扩增及表达载体构建  
根据 HSP70 编码核苷酸序列及分泌型真核表达载体 pGAPZa-A 多克隆位点序列,设计扩增全长 HSP70 CDS 的引物,并在上游引入 *EcoR* I 切点,下游引入 *Xba* I 切点。引物序列如下:HSP-F: ACCTGAATTCTCTGCAGCTAAAGGTGTAGCG-ATCG; HSP-R: TTGTTCTAGAAAGTCCACCTC-CTCAATAGTGGGCCCTGGGAGCCGG,并在下游插入 6 个组氨酸标签。以合成的罗非鱼 HSP70 序列(FJ213839.1)为模板,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 120 s,共 30 个循环;72 °C 再延伸 10 min。将 PCR 产物电泳后,经回收纯化后 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,并用 T<sub>4</sub> DNA Ligase 将 PCR 产物与用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后的 pGAPZa-A 载体连接;连接产物用 CaCl<sub>2</sub> 热休克法转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中;用双酶切方法鉴定阳性克隆,并送北京中美泰和公司测序验证,获得 pGAPZa-HSP70 表达菌株。

表达质粒电转化及阳性表达工程菌的鉴定

将 pGAPZa-*HSP70* 质粒用 *AVr* II 酶线性化,取 5  $\mu$ g 线性化后的质粒电转化毕赤酵母 (*Pichia pastoris*, PP) GS115, 经平板初步筛选后, 分别用 96 孔板连续转接培养至浓度趋于一致, 然后接种至分别含有 0.5、1.0 及 2.0 mg/mL Zeocin 的 YPD 平板筛选高拷贝转化子; 在 Zeocin 终浓度为 2.0 mg/mL 的 YPD 平板上筛选到多个转化子。毕赤酵母 GS115 菌株电转化感受态的制备及质粒提取按照 Invitrogen 公司的 Pichia Expression Kit(25-0174) 操作说明进行。用 MD 平板培养 (28  $^{\circ}$ C) 72 h 后, 挑取 6 个菌落分别置于含 10 mL MD 培养液的 50 mL 锥形瓶中, 以 250 r/min 摇床, 28  $^{\circ}$ C 下培养至 OD<sub>600</sub> 值为 5 ~ 10, 离心回收菌体, 用质粒提取试剂盒抽提 DNA 后进行 *HSP70* 特异性 PCR 鉴定。

**重组 *HSP70* 诱导表达、透析及超滤** 将 PCR 鉴定为阳性的转化子置于含 30 mL YPD 的锥形瓶中, 28  $^{\circ}$ C 下 250 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 2.0; 以 1 500  $\times$  g 离心 5 min 后弃去上清液, 将菌体悬浮于 5 mL pH 6.0 的 YPD 中, 分别取甲醇诱导前和诱导后 24、48、72、96、120 和 144 h 的发酵液上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测; 取样品电泳转膜后用 His-tag 及 *HSP70* 单抗分别进行 Western-blotting 鉴定。经鉴定后的阳性表达菌株用于后续 *HSP70* 大量诱导表达, 即挑取经过小量诱导表达筛选出的较高表达水平的菌株, 接种至含 10 mL YPD 培养基的小三角瓶中, 28  $^{\circ}$ C 下 260 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值 2.0 ~ 6.0。将 10 mL 培养物接种至含 1L YPD 的摇瓶中, 28  $^{\circ}$ C 下 260 r/min 振荡培养至对数生长期。1 500  $\times$  g 离心 5 min 收集细胞并重悬于含 300 mL YPD 培养基的 2 L 摇瓶中, 28  $^{\circ}$ C 下 260 r/min 振荡培养诱导表达。诱导至 96 h, 4  $^{\circ}$ C 1 500  $\times$  g 离心 5 min, 收集上清液。透析和超滤按文献[26]进行。

**Western-blotting** 本实验中所采用的 Western-blotting 方法参照文献[27]进行。所用鼠 His-tag 抗体检测, 一抗 1:1 000 稀释, 二抗为兔抗鼠 IgG 1:5 000 稀释。所用兔抗人 *HSP70* 抗体检测, 一抗 1:1 000 稀释, 二抗为鼠抗兔 IgG 1:3 000 稀释。

**蛋白纯化及质谱鉴定** 诱导表达上清液用 Ni<sup>2+</sup> IDA agarose 亲和层析柱进行纯化目的蛋白,

用 40 mmol/L 咪唑液进行洗脱, 流速为 2 mL/min, 收集各阶段洗脱峰, 用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子量大小和纯度, 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。用超滤离心管进行超滤浓缩, 离心过程中用 pH 为 7.3 的 PBS 更换缓冲液。将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后进行过碘酸-Schiff 试剂 (PAS) 对糖基化蛋白质染色<sup>[28]</sup>。将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后, 切取目的蛋白条带, 送广西大学生命科学院大型仪器共享平台进行标准化 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定<sup>[29]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 罗非鱼 *HSP70* 的生物信息学分析

将罗非鱼 *HSP70* 蛋白序列在线提交后得到如下结果: 氨基酸数量为 640, 分子量为 70 274.5 u, 等电点为 5.49。在哺乳动物网织红细胞 (体外) 的半衰期为 30 h, 在酵母内半衰期大于 20 h, 而在大肠杆菌内的半衰期也大于 10 h。不稳定指数为 36.64, 被界定为稳定。脂肪族指数为 85.58。糖基化位点预测表明该蛋白在 N-上有 6 个糖基化位点, 阈值为 0.5 (图 1-a), 同时在 O-上也有 6 个糖基化位点, 其分值在 420 ~ 631 之间。发现有 6 个 Cys 残基, 可形成 3 个二硫键。未发现跨膜区 (图 1-b, c)。蛋白定位在细胞质的可能性为 65.2%。总平均疏水指数为 -0.432, 总体表现为亲水性强 (图 1-d)。未发现明显的信号肽序列 (图 1-e)。该蛋白与人、小鼠、非洲爪蟾、美国红鱼、青鳉、虹鳟的 *HSP70* 蛋白的相似性均高于 75%, 与家鼠的 *HSP70* 相似性较低 (11.9%) (图 1-f)。

### 2.2 *HSP70* 序列 CDS 的 PCR 扩增及 pGAPZa-*HSP70* 构建

以合成的全长罗非鱼 CDS 序列为模板, 用设计好的特异性引物进行 PCR 扩增, 获得大小约 1 920 bp 的片段 (图 2)。将 *HSP70* 片段亚克隆 pGAPZa 载体, 阳性克隆经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 可切出约 1.9 kb 的基因片段带和约 3.1 kb 的载体带, 初步推测该基因片段已经克隆到 pGAPZa 载体 (图 3)。将阳性克隆送到北京中美泰和公司测序。将测序所得的序列和 *HSP70* 基因片段序列进行比对, 显示构建序列与预计碱基序列完全一致, pGAPZa-*HSP70* 构建成功。

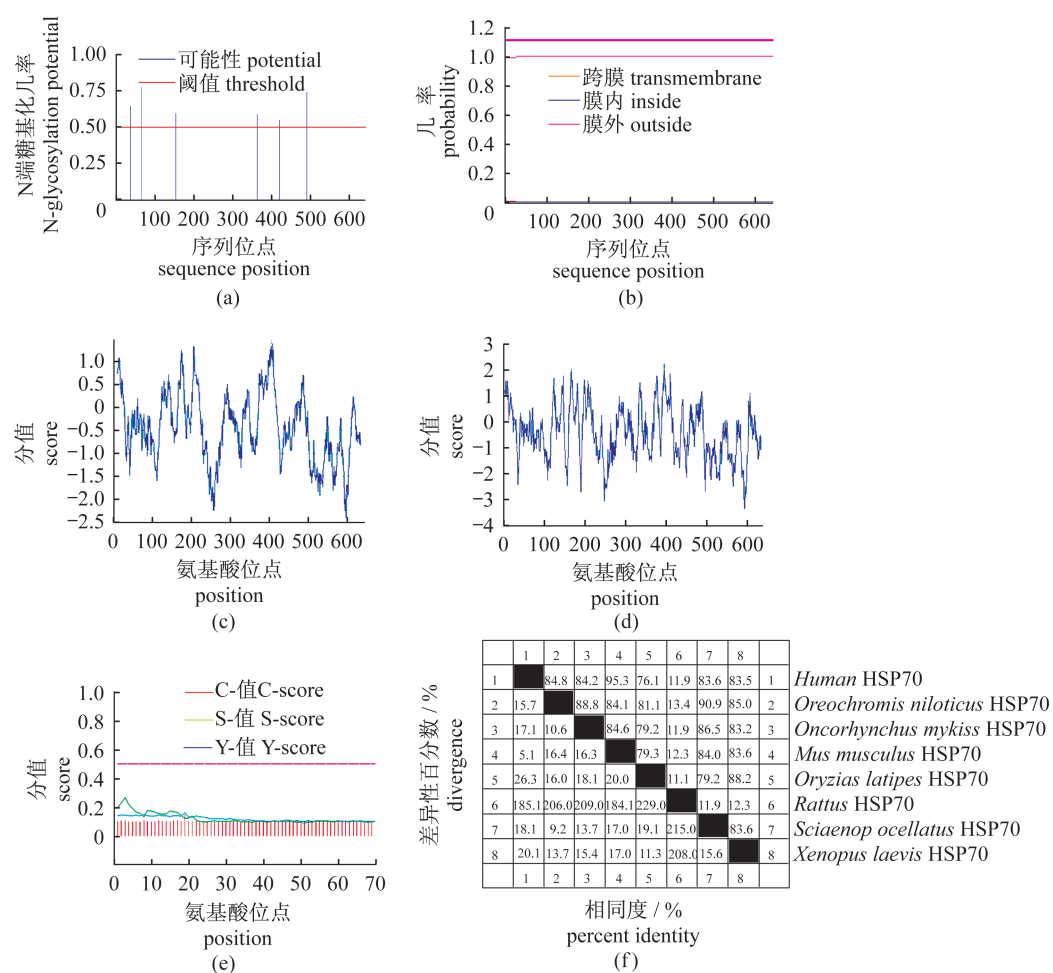


图 1 HSP70 蛋白的生物信息学分析结果

(a) N-糖基化位点预测; (b) 跨膜区预测 (TMHMM 方法); (c) 跨膜区预测 (Kyte-Doolittle 方法); (d) 疏水性预测; (e) 信号肽预测; (f) 与其他物种 HSP70 蛋白序列比对

Fig.1 Bioinformatic analysis of HSP70 protein

(a) N-linked glycosylation sites prediction; (b) transmembrane domain prediction (TMHMM method); (c) transmembrane domain prediction (Kyte-Doolittle method); (d) hydrophobicity prediction; (e) signal peptide prediction; (f) MegAlign of various HSP70 protein sequence

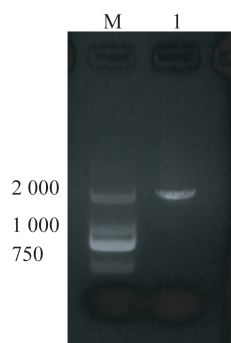


图 2 HSP70 CDS PCR 扩增结果

M. DNA 标准分子量 DL2000; 1. HSP70

Fig.2 CDS PCR amplification of HSP70

M. DNA Marker DL2000; 1. HSP70

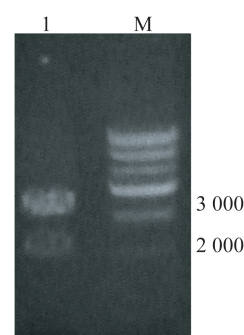


图 3 pGAPZa-HSP70 酶切鉴定图

1. pGAPZa-HSP70 酶切产物; M. DNA 标准分子量

Fig.3 Enzyme digestion of pGAPZa-HSP70 plasmid

1. bands of pGAPZa-HSP70 post digestion; M. DNA Marker

### 2.3 表达质粒电转化及阳性表达工程菌的鉴定

使用 *AVr II* 线性化重组质粒,电泳检测可见目的条带(图4)。取 5  $\mu\text{g}$  线性化后的质粒电转化毕赤酵母 GS115,经平板初步筛选后,在 Zeocin 终浓度为 2.0 mg/mL 的 YPD 平板上筛选到多个转化子(图5)。挑选其中 6 个阳性克隆,特异性引物进行 PCR 扩增,结果显示 2 号菌株条带较弱,其他均为阳性(图6)。

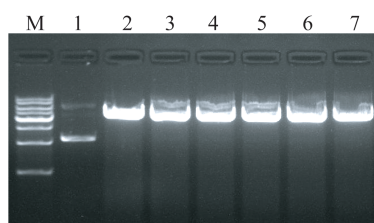


图4 重组质粒线性化结果检测

M. DNA 标准分子量; 1. 酶切前质粒; 2~6. 酶切后质粒; 标准分子量(从下到上): 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000 bp

Fig. 4 Linearization of the pGAPZa-HSP70 plasmid

M. DNA Marker; 1. plasmid before digestion; 2-6. plasmids digested; Marker: 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000 bp (down to up)

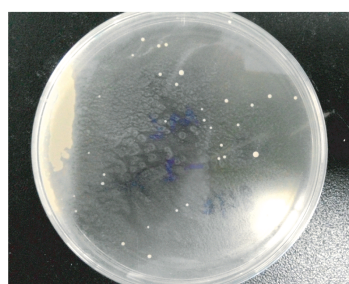


图5 平板初步筛选所得转化子

Fig. 5 Bacterial clones post the antibiotic screening

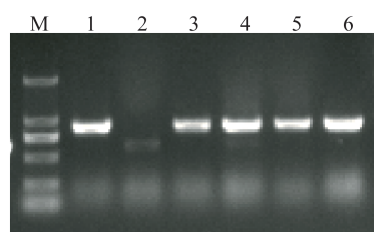


图6 转化子 PCR 鉴定结果

M. DNA 标准分子量 DL2000; 1~6. 1~6 号菌株

Fig. 6 PCR identification of the clones post antibiotic screening

M. DNA Marker DL2000; 1-6. No. 1 - No. 6 clones

### 2.4 重组 HSP70 诱导表达

分别将上述 6 株阳性菌株接种,小试培养,分别取 0、24、48、72、96、120 和 144 h 的发酵液进行 SDS-PAGE 电泳(图7),然后取培养后 72 h 发酵液用 His-tag 单克隆抗体进行 western-blotting 检测,结果显示 1、4 和 6 号菌株蛋白识别信号较强(图8)。分别取该 3 株进行培养表达,1 号菌株培养 96 h 后收取蛋白发酵液,使用 PEG 浓缩后,经 Ni 柱纯化,洗脱后,未得到目的蛋白,4 号菌株培养 72 h 后经 Ni 柱纯化,得到的蛋白浓度低于 0.1 mg/mL,不具有扩大培养意义;选定 6 菌株进行扩大培养。

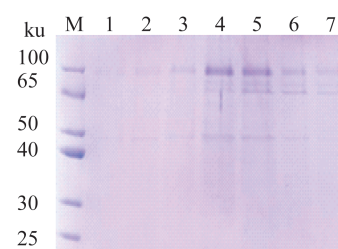


图7 发酵液进行 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白质标准分子量; 1~7. 0、24、48、72、96、120 和 144 h 培养的发酵液

Fig. 7 SDS-PAGE results of the supernatant

M. protein standard; 1-7. supernatant at 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h post induction

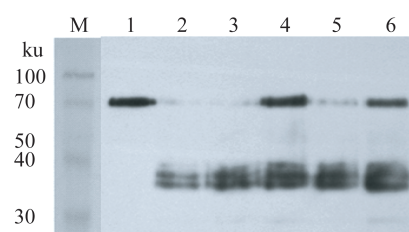


图8 培养 72 h 发酵液 Western-blotting 结果

M. 蛋白质标准分子量; 1~6. 1~6 号菌株

Fig. 8 Western-blotting results of the supernatant at 72 h post induction

M. protein standard; 1-6. No. 1 - No. 6 strains

### 2.5 蛋白纯化及质谱鉴定

将 6 号菌株进行扩大培养,诱导表达后进行 Ni 柱纯化,洗脱后进行 SDS-PAGE 电泳,并进行 BCA 蛋白浓度测定,所得蛋白 E1 浓度 0.19 mg/mL,体积 0.9 mL, E2 浓度 0.52 mg/mL,体积 2.4 mL; E3 浓度 0.24 mg/mL,体积 1.5 mL,共计蛋白约 1.8 mg(图9)。纯化结果显示,

洗脱后蛋白有两条带,初步怀疑部分蛋白形成糖基化或其他高级折叠结构,表达分子量比正常分子量偏大,使用 His-tag 和人 HSP70 抗体分别对 E1、E2、E3 进一步通过 Western-blotting 验证,结果表明表达后的 E1、E2、E3 蛋白均能被 His-tag 识别(图 10),选择其中 E2 与兔抗人 HSP70 抗体反应,显示也可被其抗体识别(图 11)。为进一步确定是否因糖基化导致表达出现双带现象,以葡萄糖和 BSA 分别作为阳性和阴性对照进行了 PAS 染色,并进行了 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定,结果显示阳性对照组葡萄糖显示强烈糖基化,阴性对照组 BSA 则染色为阴性,而测定的蛋白(E2)PAS 染色呈阳性,因此确定存在糖基化现象(图 12),质谱鉴定结果显示该糖基化的蛋白为罗非鱼 HSP70 蛋白,其蛋白分子量、等电点、蛋白评分值及所对应的主要肽段特征均与罗非鱼 HSP70 蛋白相吻合(表 1,表 2)。

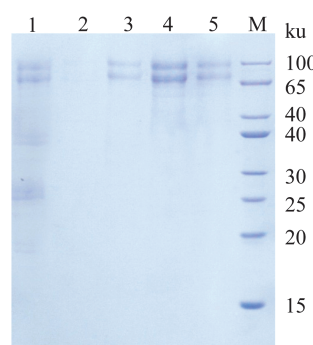


图 9 6 号菌株 72 小时发酵液 Ni 柱纯化 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白质标准分子量; 1. 浓缩后发酵液; 2. 流出液; 3. 洗脱 1(E1); 4. 洗脱 2(E2); 5. 洗脱 3(E3)

Fig. 9 SDS-PAGE results of the supernatant of No. 6 strain at 72 h post induction

M. protein marker; 1. concentrated supernatant; 2. effluent; 3. elution 1 (E1); 4. elution 2 (E2); 5. elution 3 (E3)

表 1 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定蛋白的特征

Tab. 1 MALDI-TOF-MS identification of the 100 ku protein

蛋白名称 protein name	登录号 accession no.	蛋白分子量 protein molecular weight	等电点 protein isoelectric point	肽数量 peptide count	蛋白 评分值 protein score	蛋白总分 可信度/% protein score C. I.	离子总分 total ion score	离子总分 可信度/% total ion score C. I.
heat shock protein 70 ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	gi   209171239	7 0221.1	5.49	21	680	100	400	100
heat shock protein 70 ( <i>O. aureus</i> )	gi   209974239	7 0251.1	5.489	99	77	11	18	16
heat shock protein 70 ( <i>O. niloticus</i> )	gi   207667278	7 0231.1	5.489	99	77	11	18	16

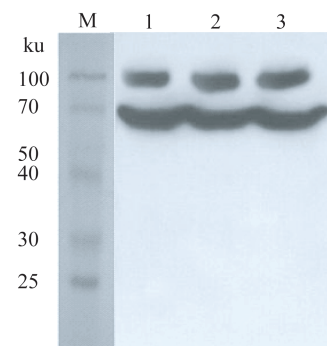


图 10 E1/E2/E3 的抗 His-tag Western-blotting 结果  
M. 蛋白质标准分子量; 1. 洗脱 1 (E1); 2. 洗脱 2 (E2); 3. 洗脱 3 (E3)

Fig. 10 Western-blotting of the E1/E2/E3 using His-Tag antibody

M. Protein Marker; 1. elution 1 (E1); 2. elution 2 (E2); 3. elution 3 (E3)

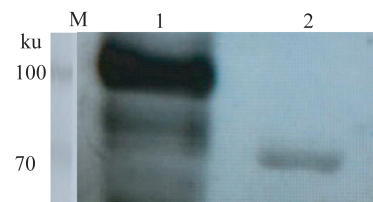


图 11 E2 的抗 HSP70 抗体 Western-blotting 结果  
M. 蛋白质标准分子量; 1. 洗脱 2 (E2); 2. 人 HSP70 蛋白

Fig. 11 Western-blotting of E2 using rabbit anti-human HSP70 antibody

M. Protein Marker; 1. elution 2 (E2); 2. human HSP70

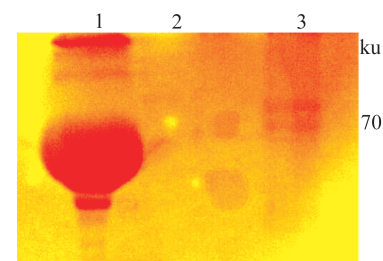


图 12 HSP70 蛋白的 PAS 染色结果

1. 葡萄糖; 2. BSA; 3. 洗脱 2 (E2)

Fig. 12 PAS staining of HSP70

1. glucose; 2. BSA; 3. elution 2 (E2)

表 2 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定蛋白所对应的肽特征  
Tab. 2 MALDI-TOF-MS identification of the peptides

理论分子量 calculated mass	实测分子量 observed mass	分子量校正 ± da	序列起始位点 start sequence	序列终止位点 end sequence	质谱匹配序列 sequence	数据类型 result type
1 003.541 8	1 003.576 5	0.034 7	512	519	LSKEEIER	Mascot
1 109.573 9	1 109.611 6	0.037 7	351	359	LLQDFNQR	Mascot
1 121.583 7	1 121.621 1	0.037 4	131	140	EIAEAYLGQK	Mascot
1 137.553 5	1 137.598	0.044 5	527	535	YKAEDDLQR	Mascot
1 197.662 6	1 197.716 2	0.053 6	461	471	FELTGIPPAPR	Mascot
1 197.694 9	1 197.716 2	0.021 3	162	173	DAGVIAGLNVLIR	Mascot
1 279.613 9	1 279.667 8	0.053 9	239	248	MVNHFVEEFK	Mascot
1 295.608 9	1 295.661 3	0.052 4	239	248	MVNHFVEEFK	Mascot
1 303.598 8	1 303.655 8	0.057	542	552	NSLESYAFNMK	Mascot
1 319.593 6	1 319.649 5	0.055 9	542	552	NSLESYAFNMK	Mascot

### 3 讨论

毕赤酵母 (PP) 作为真核表达宿主菌有着比原核表达宿主 *E. coli* 更优异的功能特性。它同其他一些高等真核生物细胞一样, 能实现对蛋白质的翻译后修饰。在 PP 中可实现多种翻译后修饰, 如信号肽剪切、折叠、二硫键形成、糖基化以及磷酸化等, 从而更接近天然形式。有学者对 PP 和 *E. coli* 中表达的同一种蛋白进行了比较研究, 发现 PP 在蛋白质翻译后修饰以及折叠形成高级结构的过程中具有的显著优势<sup>[30]</sup>。鉴于此, 本实验选择 PP 作为表达宿主菌对 tHSP70 进行真核表达, 以期获得具有生物学活性的 tHSP70, 为后续免疫学研究奠定基础。

PP 宿主菌常用的有 GS115 和 KM71 两种, 都具有 His4 营养缺陷标记。本实验选用的 GS115 菌株具有 AOX1 基因, 是 Mut<sup>+</sup>, 即甲醇利用正常型, 能很好地满足甲醇诱导表达的条件。另外, 本实验选用 pGAPZ $\alpha$  载体, 其表达的融合蛋白在 N-端带有酿酒酵母的  $\alpha$ -因子分泌信号肽, 可引导重组蛋白进入分泌途径, 使蛋白质在分泌到胞外之后获得准确的构型。生物信息学研究分析发现 tHSP70 基本不含信号肽, 在构建 pGAPZ $\alpha$ -HSP70 表达载体时, 将这段无信号肽序列的 tHSP70 置于载体序列的信号肽引导序列之后, 可在强  $\alpha$ -因子分泌信号肽引导下进行分泌性表达。实验通过甲醇诱导 PP 表达 tHSP70, 结果发现 tHSP70 得到了有效表达, 同时出现了分子量大于目的条带 (70 ku) 的另一蛋白条带 (约 100 ku)。

对于此种“双条带”现象, 我们认为最有可能

是糖基化<sup>[31-32]</sup>导致了另一条带在 SDS-PAGE 上的呈现。这是因为生物信息学分析显示 tHSP70 蛋白具有 6 个 N-糖基化位点和 6 个 O-糖基化位点, 具备了出现糖基化现象的物质基础, 很有可能形成独特的结构, 从而使得蛋白分子量增加。另外, 采用直观而便捷的 PAS 染色方法检测 tHSP70 蛋白是否发生了糖基化, 染色结果发现 tHSP70 蛋白具有阳性 PAS 染色信号, 这与生物信息学分析预测结果一致, 表明 tHSP70 蛋白在 SDS-PAGE 上的双条带现象很可能与表达过程中的糖基化现象有关。已有研究表明, 糖基化对某些外源蛋白的活性无大影响, 但糖基化可能会在机体内产生免疫反应或毒副作用<sup>[33]</sup>, 而 tHSP70 蛋白对鱼类细胞是否会有此种毒副作用还有待进一步探究。

为进一步证明所表达的蛋白是否具有免疫原性, 实验利用 tHSP70 与人 HSP70 具有很高相似性的特征, 采用兔抗人 HSP70 抗体进行 Western-blotting, 结果该抗体能很好地识别所表达的蛋白, 说明糖基化后的 tHSP70 蛋白依然具有很好的免疫学活性。为确定所表达的蛋白是否是目的蛋白 tHSP70, 实验将蛋白样品进行了 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定, 结果显示所送样品与 NCBI 数据库中罗非鱼 HSP70 蛋白序列 (gi|209171239) 具有高度相似性 (100), 进一步证明构建好的 pGAPZ $\alpha$ -HSP70 质粒可在 PP 宿主菌 (GS115) 中成功表达, 并具有免疫学活性。陈明等<sup>[34-35]</sup>研究表明, tHSP70 与海豚链球菌抗原共刺激淋巴细胞可显著增强免疫相关基因的表达量, 且在罗非鱼腹腔巨噬细胞上也具有相似作用, 因此认为 tHSP70 具有免疫增强和免疫佐剂的功能。对此,

我们比较了陈明等<sup>[36]</sup>为表达 tHSP70 蛋白所构建的表达载体和所使用的宿主菌的特点,虽然所使用的表达载体和宿主菌不同,但其表达的融合蛋白均带有酿酒酵母的  $\alpha$ -因子分泌信号肽,因为  $\alpha 2$  因子中含有 3 个 N2 糖基化位点和 1 个 *Kex2* 蛋白酶加工位点,当此酶对表达产物加工不全时可导致信号序列中潜在糖基化位点的存在,此种信号肽的载体均具有较大可能发生糖基化现象。因此,若不能准确排除宿主菌中糖基化的发生,需要对 tHSP70 自身发生糖基化进行确定后方能对后续免疫学实验结果做出正确判断。糖基化对于 PP 所表达蛋白质的功能影响因蛋白质而异,可能与糖基化位点的位置有关,由此可能出现降低<sup>[37]</sup>、增强<sup>[38]</sup>或不影响<sup>[39]</sup>蛋白功能的情况。本研究表明,对于使用 PP 系统表达的重组 tHSP70 蛋白,在明确有自身糖基化现象发生时,很有必要对该种 HSP70 蛋白进行去糖基化处理,并进一步开展其免疫学活性变化机理的研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Guzzo J. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria [ J ]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44 ( 10 ): 1698 – 1705.
- [ 2 ] Skeen M J, Miller M A, Galdiero M, *et al.* Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins [ J ]. *Infection and Immunity*, 1997, 65 : 699 – 707.
- [ 3 ] Udono H. Heat shock protein magic in antigen trafficking within dendritic cells: Implications in antigen cross-presentation in immunity [ J ]. *Acta Medicine Okayama*, 2012, 66 ( 1 ): 1 – 6.
- [ 4 ] Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, *et al.* Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells [ J ]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17 ( 8 ): 2474 – 2483.
- [ 5 ] Panjwani N N, Popova L, Srivastava P K. Heat shock protein gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs [ J ]. *Journal of Immunology*, 2002, 168 : 2997 – 3003.
- [ 6 ] Bulut Y, Faure E, Thomas L, *et al.* Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway [ J ]. *Journal of Immunology*, 2002, 168 : 1435 – 1440.
- [ 7 ] Wang Y, Kelly C G, Singh M, *et al.* Stimulation of Th-1 polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70 [ J ]. *Journal of Immunology*, 2002, 169 : 2422 – 2429.
- [ 8 ] Vabulas R M, Ahmad-Nejad P, Ghose S, *et al.* Hsp70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway [ J ]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 : 15107 – 15112.
- [ 9 ] Dybdahl B, Wahba A, Lien E, *et al.* Inflammatory response after open heart surgery: Release of heat-shock protein 70 and signaling through Toll-like receptor-4 [ J ]. *Circulation*, 2002, 105 : 685 – 690.
- [ 10 ] Gross C, Holler E, Stangl S, *et al.* An Hsp70 peptide initiates NK cell killing of leukemic blasts after stem cell transplantation [ J ]. *Leukemia Research*, 2008, 32 ( 4 ): 527 – 534.
- [ 11 ] Gastpar R, Gehrman M, Bausero M A, *et al.* Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells [ J ]. *Cancer Research*, 2005, 65 ( 12 ): 5238 – 5247.
- [ 12 ] Murshid A, Theriault J, Gong J, *et al.* Investigating receptors for extracellular heat shock proteins [ J ]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 787 : 289 – 302.
- [ 13 ] Pawaria S, Binder R J. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization [ J ]. *Nature Communication*, 2011, 2 : 521.
- [ 14 ] Wang S Z. Progress of the biological functions of heat shock proteins and their anti-tumor effects [ J ]. *The Journal of Practical Medicine*, 2006, 22 ( 8 ): 969 – 971. [王森舟. 热休克蛋白的生物功效及与肿瘤热疗的研究进展. *实用医学杂志*, 2006, 22 ( 8 ): 969 – 971.]
- [ 15 ] Tamura Y, Peng P, Liu K, *et al.* Immunotherapy of tumors with antologous tumor-derived heat shock protein preparations [ J ]. *Science*, 1997, 278 : 117 – 120.
- [ 16 ] Kothary R K, Burgess E A, Candido E P M. The heatshock phenomenon in cultured cells of rainbow trout; HSP70 mRNA synthesis and turnover [ J ]. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 1984, 783 ( 2 ): 137 – 143.
- [ 17 ] Arai A, Naruse K, Mitani H, *et al.* Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock



- proteins(HSP70) from two fish species of the genus *Oryzias* [J]. *Japanese Journal of Genetics*, 1995, 70 (3):423 - 433.
- [18] Lele Z, Engel S, Krone P H. HSP47 and HSP70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos [J]. *Developmental Genetics*, 1997, 21(2):123 - 133.
- [19] Lim E H, Brenner S. Short-range linkage relationships, genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five HSP70 genes in *Fugu rubripes* [J]. *Cell and Molecular Life Sciences*, 1999, 55(4):668 - 678.
- [20] Molina A, Biemar F, Muller F, *et al.* Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish [J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2000, 474(1):5 - 10.
- [21] Park J H, Lee J J, Yoon S, *et al.* Genomic cloning of the HSC71 gene in the hermaphroditic teleost rivulus marmoratus and analysis of its expression in skeletal muscle: Identification of a novel muscle-preferred regulatory element [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(14):3041 - 3050.
- [22] Ali K, Dorgai L, Abraham M, *et al.* Tissue and stressorspecific differential expression of two HSC70 genes in carp [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 307(3):503 - 509.
- [23] Deane E E, Woo N Y. Cloning and characterization of the HSP70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3):776 - 783.
- [24] Zhang Z X, Li M Y, Chen J, *et al.* Heat shock protein (hsp) gene from *pseudosciaena crocea*: Cloning, prokaryotic expressing, and antiserum formation [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(4):337 - 341. [张祖兴, 李明月, 陈炯, 等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 热激蛋白的基因克隆、原核表达及抗血清的制备. *海洋与湖沼*, 2006, 37(4):337 - 341.]
- [25] Wan W J. Molecular cloning of two members of HSP70 and their transcriptional regulation responding to vibrio alginolyticus infection and immunization in *Xiphophorus helleri* [D]. Jinan: Shandong Agricultural University, 2006. [万文菊. 剑尾鱼 HSP70 家族两成员的分子克隆及溶藻弧菌感染与免疫对其基因的诱导表达. 济南: 山东农业大  
学, 2006.]
- [26] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Short protocols in molecular biology [M]. Third Edition. John Wiley and Sons, 1995.
- [27] Imamura Y, Wang P L. Salivary histatin 3 inhibits heat shock cognate protein 70-mediated inflammatory cytokine production through toll-like receptors in human gingival fibroblasts [J]. *Journal of Inflammation (Lond)*, 2014, 11(1):4.
- [28] Kimura Y, Stadtman T C. Glycine reductase selenoprotein A is not a glycoprotein: The positive periodic acid-Schiff reagent test is the result of peptide bond cleavage and carbonyl group generation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(6):2189 - 2193.
- [29] Zhang Y G, Jiang R Q, Guo T M, *et al.* MALDI-TOF-MS serum protein profiling for developing diagnostic models and identifying serum markers for discogenic low back pain [J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2014, 15:193.
- [30] Lueking A, Holz C, Gotthold C, *et al.* A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression & Purification*, 2000, 20:372 - 378.
- [31] Bill R M, Revers L, Wilson I B H. Protein glycosylation [M]. Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [32] Varki A. Biological roles of oligo Saceharides: All of the theories are correct [J]. *Glycobiology*, 1993, 3:97 - 130.
- [33] Yan X, Yu H Q, Cheng G X. Progress of protein glycosylation and immune research [J]. *Current Immunology*, 2008, 28(2):165 - 168. [严钦, 俞慧清, 成国祥. 蛋白糖基化与免疫研究进展. *现代免疫学*, 2008, 28(2):165 - 168.]
- [34] Chen M, Wang Q H, Wang R, *et al.* Effects of recombination HSP70 on immune function of tilapia peripheral blood lymphocyte [J]. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 2011, 26(suppl.):213 - 218. [陈明, 王秋华, 王瑞, 等. 重组 HSP70 对罗非鱼外周血淋巴细胞免疫功能的影响. *华北农学报*, 2011, 26(增刊):213 - 218.]
- [35] Chen M, Wang Q H, Wang R, *et al.* Effects of recombinant tHsp70 on immune function of tilapia peritoneal macrophages [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1):145 - 153. [陈明, 王秋华, 王瑞, 等. 重组 tHsp70 对罗非鱼腹腔巨噬细胞免疫功能的影响. *中国水产科学*, 2012, 19(1):145 - 153.]

- [36] Chen M, Wang Q H, Wang R, *et al.* Expression and purification of recombinant tilapia heat shock protein 70 in yeast *Pichia pastoris*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(1): 58 – 62. [陈明, 王秋华, 王瑞, 等. 罗非鱼热休克蛋白 70 在毕赤酵母中的表达与纯化. 大连海洋大学学报, 2011, 26(1): 58 – 62.]
- [37] Henriksson H, Denman S E, Campuzano I D, *et al.* N-linked glycosylation of native and recombinant cauliflower xyloglucan endotransglycosylase 16A [J]. Biochemical Journal, 2003, 375 ( suppl. ): 61 – 73.
- [38] Pratap J, Rajamohan G, Dikshit K L. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*; Enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(4): 469 – 475.
- [39] Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites; Implications for protein engineering [J]. Protein Engineering 1990, 3 ( 5 ): 433 – 442.

## Bioinformatics analysis, eukaryotic expression and mass spectrum identification of the tilapia HSP70 protein

LUO Honglin<sup>1</sup>, ZHANG Yaoyao<sup>2</sup>, LIANG Wanwen<sup>1</sup>, CHEN Fuyan<sup>1</sup>, LI Min<sup>1</sup>, GAN Xi<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory for Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,

Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China;

2. Institute of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** The physical and chemical property, glycosylation site, transmembrane domain, cellular localization, signal peptide of tilapia HSP70(tHSP70) and percent identity to the HSP70 derived from rainbow trout and other species(tHSP70) were analyzed by bioinformatics methods, and the full CDS of tHSP70 was amplified and cloned by using and the artificially synthesized cDNA. The expression plasmid of pGAPZa-HSP70 was constructed by the insertion of tHSP70 CDS into the pGAPZa-A vector, and the tHSP70 protein was then expressed in host strain of GS115. The supernatant was used to conduct the SDS-PAGE and Western-blotting, followed by the purification of tHSP70 by Ni<sup>2+</sup> IDA affinity chromatography. Then the PAS staining was used to identify if the glycosylations occurred in tHSP70 protein after the expression from GS115. Then the non-expected band (about 100 bp) in the SDS-PAGE was identified by standard MALDI-TOF-MS procedure. Bioinformatic analysis showed tHSP70 contains 640 amino acids, the molecular weight is 70 274.5 mol/L and the isoelectric point is 5.49. The half-life of tHSP70 is 30 h in mammalian reticulocyte (*in vitro*) and greater than 20 h in yeast, while it is more than 10 h in *Escherichia coli*. Additionally, the instability index and aliphatic index of tHSP70 is 36.64 and 85.58, respectively. Moreover, tHSP70 might totally contain 6 O-linked and 6 N-linked glycosylation sites. The cloned tHSP70 sequence was 100% identity to the sequence in NCBI database. The HSP70 protein could be efficiently expressed by methane induction of pGAPZa-HSP70 plasmid in GS115 strain. Except the 70 ku band, one 100 ku was observed on the SDS-PAGE and Western blotting gels. The PAS staining specific to the glycosyl radicals was performed and the positive signals indicated that this 100 ku band might be the consequence of glycosylations after expression in GS115. Western blotting showed the protein currently expressed was recognized by rabbit anti-human HSP70 antibody, and the MALDI-TOF-MS result demonstrated that the 100 ku protein was exactly the tilapia HSP70, 100% identity to the tilapia HSP70 in NCBI database. The present study provided experimental materials for the future cellular and immunological researches in tilapia.

**Key words:** tilapia HSP70; eukaryotic expression; glycosylation; mass spectrum identification

**Corresponding author:** GAN Xi. E-mail: ganxien@126.com