

陈晓燕,黄明珠,张妮,等. 南美白对虾 CuZnSOD 原核表达及抗体制备[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):193-195.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.20.047

南美白对虾 CuZnSOD 原核表达及抗体制备

陈晓燕,黄明珠,张妮,刘欢,朱芳芳,熊志伟

(江西科技学院护理学院,江西南昌 330098)

摘要: 铜超氧化物歧化酶(cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase, CuZnSOD)是超氧化物歧化酶家族的一种,超氧化物歧化酶在动植物的抗氧化和免疫功能中扮演着重要的角色。本研究将南美白对虾胞外 CuZnSOD 基因与 pet32a 表达载体连接,转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导融合表达,经 SDS-PAGE 分析表明,融合蛋白主要以包涵体形式存在,分子量约为 18 ku。利用 Ni 柱亲和纯化发酵产物,得到较单一的蛋白,制备了多克隆抗体。

关键词: 胞外 CuZnSOD;原核表达;纯化;组织分布

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)20-0193-03

南美白对虾是当今世界水产养殖产量最高的三大虾类之一。近年来,日益严重的南美白对虾病害,已对某些区域造成了毁灭性的打击,随着我国南美白对虾养殖业的进一步扩大,病原体的变异、新型病原的出现、病害的防控形势不容乐观^[1]。南美白对虾病害主要有红体病(又称“桃拉综合症”)、蜕壳综合症、固着类纤毛虫病、白斑病、黑鳃病、弧菌病、亚硫酸盐中毒症、应激性反应^[2]。其中弧菌病最为猖獗,近年我国的对虾养殖业特别是华南地区的对虾养殖领域遭受到严重的病害肆虐,发病率及排塘率都在 50% 以上,个别甚至达到 90%。整个疫情中弧菌贯彻始终^[3]。

机体在对抗病害、重金属、环境等因素胁迫时,会导致负氧离子等氧化自由基(ROS)的产生^[4-5],高浓度的氧化自由基会导致细胞损伤甚至是细胞死亡^[6]。高浓度氧化自由基的消除需要依靠包括超氧化物歧化酶(SOD)在内的抗氧化酶系统,SOD 能将体内有毒的负氧离子歧化为无毒的氧分子和较低毒性的过氧化氢分子^[7]。铜超氧化物歧化酶(cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase, CuZnSOD)是目前发现的一类主要细胞外的发挥抗氧化作用的抗氧化酶^[8]。南美白对虾 CuZnSOD 在虾体对抗溶藻弧菌和白斑综合症病毒胁迫是扮演着重要的角色^[9]。本研究将南美白对虾胞外 CuZnSOD 基因与 pet32a 表达载体连接,转化进入大肠杆菌 BL21 中并成功表达出融合蛋白。融合蛋白分子量约为 18 ku。利用 Ni 柱亲和纯化发酵产物,制备了多克隆抗体,以为将来的南美白对虾胞外 CuZnSOD 的应用和研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

收稿日期:2016-05-19

基金项目:江西省教育厅科技研究项目(编号:GJJ151148);江西科技学院青年基金项目(编号:ZR15QN06)。

作者简介:陈晓燕(1984—),女,江西抚州人,硕士,讲师,主要从事药理学研究。

通信作者:黄明珠,硕士研究生,主要从事动物分子免疫学研究。

E-mail:491951061@qq.com。

1.1.1 菌株和载体 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 菌株,原核表达载体 pet32a,均由江西科技学院护理学院生理实验室保存,PMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂 NC 膜为 Pall Life Science 公司产品,Ni NTA 填料,Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;弗氏完全佐剂/弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品;反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒为 Axygen 公司产品;预染低分子量蛋白 maker 为 BIO-RAD 公司产品;Tryptone, Yeast Extract, peptone 为 MD Bioscience 公司产品;动物蛋白提取试剂盒为上海生工生物有限公司产品;碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG 为北京鼎国生物科技有限公司产品。其余为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上的南美白对虾 CuZnSOD 基因序列(ADM64316.1)设计包含酶切位点的特异性引物,SODs: 5'-GCCAATTCATGAAGACGTTGGCAACTCT-GCTGGCTGTG-3'(包含 EcoR I 酶切位点、起始密码子;SODm-x: 5'-GCTCTAGATTAATGATGATGATGATGATGGGA-ACCCTCTCTCAGTGATGGTGCAGCAGGC-3'(包含 Xba I 酶切位点、终止密码子、6×his 标签)扩增 CuZnSOD 开放性阅读框(ORF)。引物由深圳华大基因合成。

1.2.2 南美白对虾肝胰腺 RNA 提取和 cDNA 的合成 取肝胰腺液氮冷冻研磨,按照说明书 Trizol 法提取 RNA,按照反转录试剂盒说明书文献^[9]合成 cDNA。

1.2.3 扩增目的基因 以 cDNA 为模板,利用设计的特异性引物进行 PCR 扩增,程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,63℃ 30 s,72℃ 45 s,30 个循环;72℃ 5 min,12℃ 保存。PCR 产物跑 1% 琼脂糖胶电泳,紫外灯下切胶,采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收。

1.2.4 鉴定目的片段 将上述回收的 DNA 片段与 PMD-18T 载体连接后,转化大肠杆菌 DH5 α ,转化后涂平板,37℃ 培养过夜,挑阳性克隆进行菌液 PCR,送上海生工测序。测序正确的载体命名为 PMD-18T-SOD。

1.2.5 表达载体构建 用限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I 对

PMD-18T-SOD 和 pet32a 载体进行双酶切,酶切产物跑 1% 琼脂糖胶电泳,紫外灯下切胶,采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收,回收产物按摩尔比 1:5 混合,按比例加入 T₄ DNA 连接酶,4 ℃ 过夜,转化 DH5 α ,转化后涂平板,37 ℃ 培养过夜,挑阳性克隆进行菌液 PCR,送上海生工测序。测序正确的载体命名为 pet32a-SOD。

1.2.6 融合蛋白诱导 将构建的重组表达质粒转化进入 BL21,转化后涂平板,37 ℃ 培养过夜,挑阳性克隆进行菌液 PCR 验证。验证正确的菌株接种于含 100 mmol/L Amp 的 LB 液体培养基中,180 r/min,37 ℃ 培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.4~0.6,加入 IPTG,使之终浓度为 1 mmol/L,诱导 3 h 后开始取样,每隔 1 h 取样 1 次,通过跑 SDS-PAGE 蛋白胶检测蛋白表达情况。

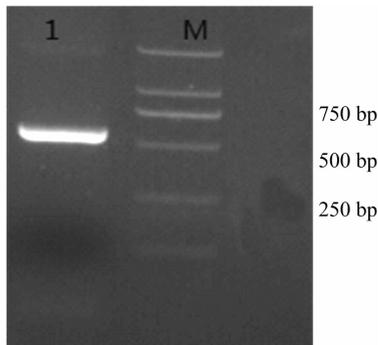
1.2.7 发酵产物纯化 大量发酵后,收集菌体,磷酸缓冲液重悬,在超声波下破碎 30 min;8 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,弃上清;用含 4 mol/L 尿素的缓冲液重新溶解,12 000 r/min 4 ℃ 离心 20 min,留上清,0.4 μm 滤膜过滤;依照 Ni-NAT 操作手册进行蛋白纯化^[9],跑 SDS-PAGE 蛋白胶检测蛋白纯化情况。

1.2.8 各组织蛋白检测 重组蛋白溶液(含 0.5~1.0 mg 重组蛋白)加等体积弗氏完全佐剂,用注射器混匀,多点注射于大白兔腹部及腹股沟,每隔 7 d 免疫 1 次,免疫 4 次后,收集血清^[9]。根据动物蛋白提取试剂盒提取南美白对虾眼柄、鳃、肝胰腺、肌肉、肠、血细胞和心脏的总蛋白,提取的总蛋白分别用 Bradford 法^[10]测定浓度,血清与虾各组织 20 μg 总蛋白按照 Towbin 法^[11]做 Western Bolt。

2 结果与分析

2.1 目的片段扩增和表达载体构建

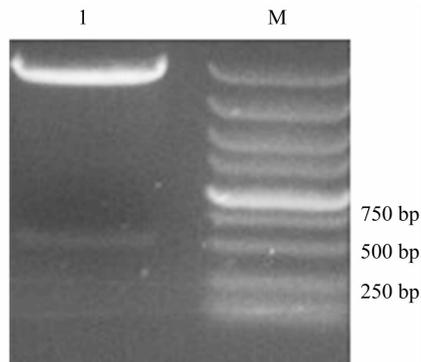
以 cDNA 为模板扩增目的片段,跑 1% 琼脂糖凝胶,约 500 bp 处有明显亮带,符合预期大小,经测序证明确为 *CuZnSOD* 序列(图 1);双酶切连接载体后,转化 BL21,扩大培养后,提取质粒,对质粒进行双酶切验证,结果显示有 2 条亮带,1 条为开环 pet32a,1 条约 500 bp 大小为目的片段,证实构建表达载体成功(图 2)。



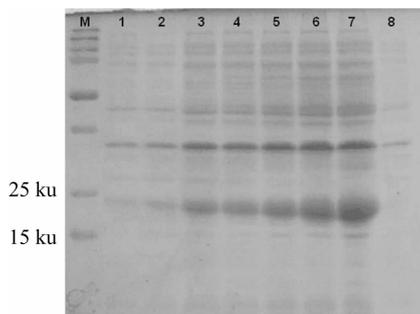
M—DNA 标准 DL2000; 1—PCR^{产物}
图 1 *CuZnSOD* ORF PCR 产物检测

2.2 融合蛋白诱导表达及纯化

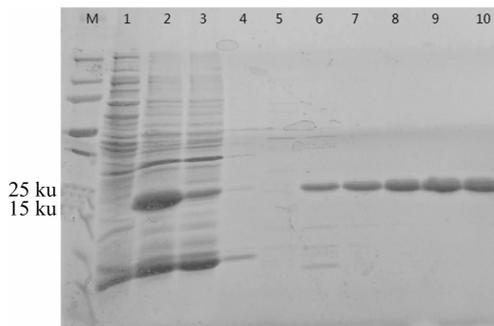
构建好的表达菌株经 IPTG 诱导表达后,经 SDS-PAGE 跑胶检测,以加入 IPTG 之前菌液为空白对照,经 IPTG 诱导的菌液在 18 ku 左右有明显条带,与预期大小相符(图 3);通过 Ni 柱纯化后得到较单一条带;由图 4 可知,发酵液上清没



M—DNA 标准 DL2000; 1—重组载体双酶切产物
图 2 重组载体双酶切验证



M—蛋白分子量标准; 1~7—分别为诱导发酵 3、4、5、6、7、8、9、10 h; 8—空白对照
图 3 表达产物 SDS-PAGE 分析



M—蛋白分子量标准; 1—发酵液上清; 2—包涵体; 3—穿透液; 4—结合缓冲液洗脱; 5—洗脱缓冲液洗脱; 6~10—剥离缓冲液洗脱
图 4 融合蛋白的蛋白纯化

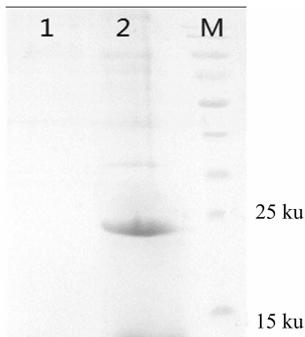
有目的蛋白,目的蛋白以包涵体的形式存在;穿透液中仍有少量目的蛋白没有结合上 Ni 柱,经结合缓冲液洗掉杂带后,最后通过剥离洗脱液获得较纯的目的蛋白。

2.3 抗体制备及各组织蛋白相对量检测

纯化蛋白免疫新西兰白兔后,取血清,用抗体稀释液与肝胰腺总蛋白进行 Western Bolt,结果发现在 18 ku 左右有明显条带,伴有较多杂带(图 5)。

3 讨论

SOD 酶活性在水产养殖领域已经被当作动物免疫活性的一项指标^[12-15]。目前,对虾中 MnSOD 有较多研究,胞外 *CuZnSOD* 只有在南美白对虾中克隆出基因序列,且 *CuZnSOD* mRNA 在血细胞和肠道中表达量最大,在心脏、眼柄和肌肉表



M—蛋白分子量标准；1—对照；2—肝胰腺
图5 多克隆抗体验证

达量较少^[16]。在虾受到应激时,肌肉颜色变深,在抗氧化防御中起着重要的作用,可能在血液将 CuZnSOD 蛋白运输至肌肉组织时,发挥抗氧化作用,导致肌肉中 mRNA 含量低,而蛋白表达量很高。本试验扩增目的片段过程中所用的特异性引物的下游引物 SODm-x 中直接人为添加 6 × his 标签和终止密码子,提前终止了表达,这样就能将 pet32a 载体上自带的分子量较大的 GST 标签和一些不必要的氨基酸序列连在表达的融合蛋白上,所表达的融合蛋白与源序列更为接近。多克隆抗体具有特异性较低的缺点^[17],制备的兔抗南美白对虾胞外 CuZnSOD 多克隆抗体进行抗体特异性检测时,出现一些杂带,但是目的条带相对较明显,多抗可用于下一步试验。SOD 在工业和农业上有大量应用^[18],本试验中的南美白对虾胞外 CuZnSOD 原核表达及产物纯化技术为其在工业及农业的应用打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 杨先乐,郑宗林. 南美白对虾病害流行的新动向及其思考[J]. 淡水渔业,2005,35(3):3-6.
- [2] 何义进. 南美白对虾主要疾病及防控技术[J]. 齐鲁渔业,2004,21(4):40-42.
- [3] 阮记明,黄建珍,章海鑫,等. 弧菌病,对虾养殖难以回避的话题[J]. 海洋与渔业,2011(4):56-57.
- [4] Chanock S J, Benna J, Smith R M, et al. The respiratory burst oxidase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269: 24519-24522.
- [5] Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2000, 191: 89-107.
- [6] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.
- [7] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase [J]. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64: 97-112.
- [8] Nozik - Grayck E, Suliman H B, Piantadosi C A. Extracellular superoxide dismutase [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37: 2466-2471.
- [9] Huang M, Liu Y, Xie C, et al. LvDJ-1 plays an important role in resistance against *Vibrio alginolyticus* in *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 180-186.
- [10] 杨桂兰,郭学平. Lowry 法和 Bradford 法测定玻璃酸钠中蛋白质含量的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2003(3): 131-133.
- [11] Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979(9): 4350-4354.
- [12] 艾春香,陈立侨,高露姣,等. 维生素 C 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. 台湾海峡, 2002, 21(4): 431-438.
- [13] 姚翠鸾,王维娜,王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 海洋科学, 2003(10): 18-21.
- [14] Rajesh K S, Ishaq A V, Sarathi M, et al. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Fish Shellfish Immunol 2008, 24: 467-478.
- [15] Kim Y S, Ke F, Zhang Q Y. Effect of β -glucan on activity of antioxidant enzymes and *Mx* gene expression in virus infected grass carp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 336-340.
- [16] Tian J, Chen J, Jiang D, et al. Transcriptional regulation of extracellular Copper Zinc superoxide dismutase from white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* and WSSV infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 234-240.
- [17] 贾慧娜,罗海玲. 多克隆抗体制备方法的研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2012(增刊1): 66-69.
- [18] 董亮,何永志,王远亮,等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013(5): 53-58.
- [9] 乔志文. 我国甜菜病虫害种类分布及化学防治历程[J]. 中国糖料, 2003(4): 42-46.
- [10] 卢秉福,耿贵,周艳丽. 甜菜块根收获机械化技术[J]. 中国糖料, 2013(2): 65-67.
- [11] 韩长杰,尹文庆,杨宛章,等. 甜菜机械化收获方式分析与探讨[J]. 中国农机化, 2012(1): 71-74.
- [12] Vargas - Ramirez J M, Haagenson D M, Pryor S W. Beet tissue ensiling; an alternative for long - term storage of sugars in industrial beets for nonfood use [J]. Biomass and Bioenergy, 2016, 85(85): 135-143.
- [13] Bezhin K, Santel H J, Gerhards R. Evaluation of two chemical weed control systems in sugar beet in Germany and the Russian Federation [J]. Plant Soil and Environment, 2015, 61(11): 489-495.
- [14] 刘巧红,程大友,徐德昌,等. 甜菜种子无菌苗的制备与快速繁殖技术[J]. 中国甜菜糖业, 2008(3): 21-22.
- [15] 牛素清,白晨,张惠忠,等. 甜菜组培快繁及植株再生的研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊1): 16-19.

(上接第 108 页)