

刘欢,黄明珠,陈晓燕,等. 凡纳滨对虾 P53 亲水肽段原核表达及抗体制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):178-180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.044

凡纳滨对虾 P53 亲水肽段原核表达及抗体制备

刘欢,黄明珠,陈晓燕,房春娟,姜雯雯,朱芳芳,熊志伟

(江西科技学院护理学院,江西南昌 330098)

摘要:在哺乳动物细胞中,肿瘤抑制基因 P53 是目前研究最为广泛和系统的抑癌基因之一。P53 参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程,在甲壳动物中研究较少。对 LvP53 的蛋白质全序列进行抗原性分析,将编码亲水肽段 DNA 连接到 Pet32a 表达载体上,转化原核表达菌株 BL21,利用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside,简称 IPTG)诱导融合蛋白质表达,经蛋白电泳分析表明,融合蛋白主要以包涵体形式存在。利用 Ni 柱亲和纯化发酵产物,得到较单一的蛋白,以制备多克隆抗体。

关键词:P53;原核表达;纯化;多克隆抗体

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)07-0178-03

凡纳滨对虾(别称南美白对虾)是当今世界水产养殖业产量最高的三大虾类之一。随着养殖规模的扩大,对虾病害已经成为制约该产业发展的重要障碍。凡纳滨对虾为较低等的水生节肢动物,其生理特征表现为对病害的易感性。生长、发育的生命周期较短,各器官和系统形成迅速、构造简单,较高的新陈代谢水平和较低等的器官结构使得凡纳滨对虾对病原体抵抗能力较弱。凡纳滨对虾的鳃直接与水体接触,在进

行呼吸和排泄时,各种外界恶劣的环境条件直接接触鳃结构,因此病原体较易感染或通过鳃部而影响全身。凡纳滨对虾的生命周期中有蜕壳的生理特点,蜕壳前凡纳滨对虾停止进食,蜕壳之后虾体又非常脆弱,在此期间虾体的防御能力减弱,对病原体和敌害的抵抗力极差,因而极易被病原体感染^[1]。随着养殖水域受到严重污染,水质的富营养化,水体的酸碱化,重金属污染等都是目前非常严重的问题^[2],养殖强度的扩大和养殖环境恶化将给对虾病害的控制带来更大的挑战。

机体在对抗病害、重金属、环境等因素胁迫时,会导致负氧离子等活性氧(ROS)的产生^[3-4],高浓度的氧化自由基会导致细胞损伤甚至细胞死亡^[5]。P53 与 DNA 的完整性、细胞周期、呼吸暴发都有密切联系^[6-7]。亚硝酸盐应诱导对虾血细胞产生了过量的 NO 和 ROS,造成氧化胁迫作用,诱导凋亡 P53 基因的表达^[8]。在重金属和低 pH 值环境的应激下,凡纳滨对虾 P53 基因表达与 LvMnSOD 和 LvGPx 有着密切的

收稿日期:2016-11-19

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

作者简介:刘欢(1985—),女,江西宜春人,硕士,主要从事动物分子免疫学研究。Tel:(0791)88136682;E-mail:373740643@qq.com。

通信作者:黄明珠,硕士,主要从事动物分子免疫学研究。Tel:(0791)88136684;E-mail:huangmingzhu12@163.com。

2015,362(1):1-8.

[11] Hu M, Wang N, Pan Z H, et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(3): 224-233.

[12] Hossain M J, Sun D W, McGarey D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States - farmed catfish[J]. mBio, 2014, 5(3): e00814-e00848.

[13] 刘杰,龙宜楠,黄钧,等. 黄颡鱼暴发性流行病原的分离鉴定及其 3 种毒力基因检测[J]. 淡水渔业, 2015(2): 56-61.

[14] 朱成科,向桢,叶华,等. 黄颡鱼致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(5): 37-42.

[15] 夏飞,梁利国,谢骏. 团头鲂病原嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 606-610.

[16] 梁利国,谢骏,叶叶尧. 鲢病原嗜水气单胞菌分离鉴定及检测方法建立[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(5): 374-378.

[17] 王亚冰,梁利国,高金伟,等. 异育银鲫源杀鲑气单胞菌杀鲑亚

种的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2016(7): 1532-1539.

[18] 隗黎丽,吴华东,阮记明. 黄颡鱼鲷爱德华氏菌的分离及鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2014(1): 187-192.

[19] 廖雨婷. 鲷爱德华氏菌感染黄颡鱼的病理形态学及病原分布研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2012.

[20] 黄钧,彭民毅,罗华平,等. 黄颡鱼源温和气单胞菌对氟苯尼考耐药性获得与消失速率研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(3): 1278-1281.

[21] Wu, S, Tian J, et al. Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(5): 2165-2174.

[22] Quinn R A, Stevenson R M. Denaturing gradient gel electrophoresis for nonlethal detection of *Aeromonas salmonicida* in salmonid mucus and its potential for other bacterial fish pathogens[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(5): 563-571.

[23] 徐伯玄,葛蕊芳,熊木林. 二龄草鱼肠炎病发病机理[J]. 水生生物学报, 1988, 12(4): 8.

[24] 周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 613-617.

联系^[9]。十足目的 P53 对损伤的 DNA 进行修复以保证正常的精子发生,或引发凋亡以去除不正常的精细胞^[10]。本研究通过分析凡纳滨对虾 P53 序列亲水性,利用原核表达获得亲水肽段,免疫大白兔获得多克隆抗体,探索出 1 条简单高效地获得 P53 多克隆抗体的途径,为 P53 的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1.1 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, PMD - 18T 载体,购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂 弗氏完全佐剂/弗氏不完全佐剂,为 Sigma 公司产品;NC 膜为 Pall Life Science 公司产品;Ni NTA 填料、Trizol 试剂,购自 Invitrogen 公司;酵母浸出膏、胰蛋白胨、蛋白胨,为 MD Bioscience 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒、限制性内切酶、质粒小提试剂盒,为 Axygen 产品;反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit、T4DNA 连接酶,为 TaKaRa 公司产品;预染低分子量蛋白 Marker,为 BIO – RAD 公司产品;动物蛋白提取试剂盒,为生工生物工程(上海)股份有限公司产品;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。其余产品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 从 GenBank 获得凡纳滨对虾 P53 基因序列 (ANN87874.1), 通过在线网站 (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input) 预测 P53 亲水肽段, 根据亲水肽段编码序列设计特异性引物, 即上游引物 P53s: 5' - GCGAATTCATGCGTCACAAATTCGGCATCTCCCTC C - 3', 下游引物 P53x: 5' - GCTCTAGATTAATGATGATGATG ATGATGGCAC TTGCAGCACTTAATGTCCAG - 3' (包含酶切位点、终止密码子、6 × His 标签) 扩增 P53 亲水肽段。引物由深圳华大基因合成。

1.2.2 凡纳滨对虾肝胰腺 RNA 提取和 cDNA 的合成 取肝胰腺,液氮冷冻研磨,按说明书 Trizol 法提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA。

1.2.3 扩增目的基因 以“1.2.2”节步骤中合成的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℃ 4 min,4℃保存。PCR产物通过1%琼脂糖胶电泳检测,紫外

灯下切胶后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。

1.2.4 鉴定目的片段 将“1.2.3”节步骤回收的 DNA 片段与 PMD-18T 载体连接后,转化大肠杆菌 DH5a,转化后涂氨苄青霉素 (Amp) 固体平板,37 °C 培养过夜,挑阳性克隆进行菌液 PCR,测序。测序正确的载体命名为 PMD-18T-P53。

1.2.5 表达载体构建 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 对 PMD-18T-P53 和 pet32a 载体分别进行双酶切,酶切产物跑 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下切胶,通过 DNA 凝胶回收试剂盒回收,回收产物按物质的量比 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℃ 过夜培养,挑阳性克隆进行菌液 PCR 检测,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序正确的载体命名为 pet32a-P53。

1.2.2.6 融合蛋白诱导 将构建的重组表达质粒转化进 BL21, 转化后涂平板, 37 °C 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 °C 培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.4 ~ 0.6, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, 简称 IPTG), 使之终浓度为 1 mmol/L, 诱导 3 h 后, 每隔 1 h 取样, 跑十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 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,用磷酸缓冲液重悬,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,跑 SDS-PAG 蛋白胶检测蛋白纯化情况。

1.2.8 抗体制备 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,分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。

2 结果与分析

2.1 目的片段扩增

由图1、图2可知,通过在线网站预测 P53 亲水肽段,以编码亲水肽段 cDNA 为模板扩增目的片段,琼脂糖凝胶电泳验证表明,在 500 bp 左右有亮带,与预期大小相符,经测序证实确为 P53 序列。

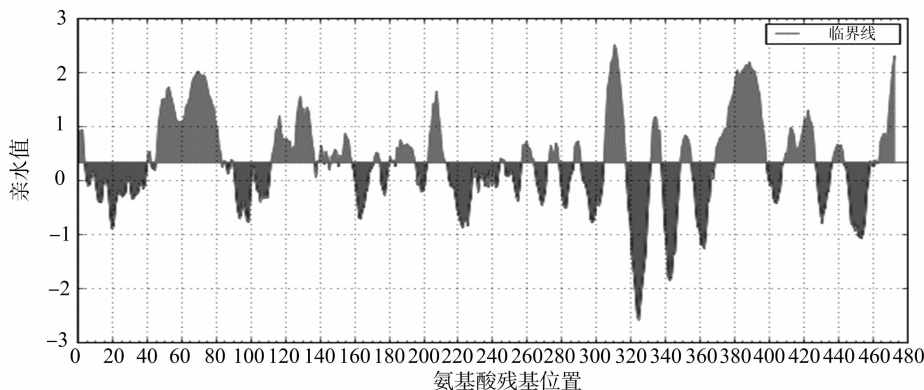


图1 预测 p53 亲水肽段

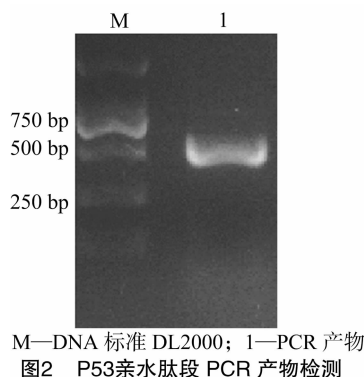


图2 P53亲水肽段 PCR 产物检测

2.2 表达载体构建

分别双酶切载体和目的基因后,连接酶切后所需片段,转化大肠杆菌 BL21,扩大培养后,提取质粒,对质粒进行双酶切验证。由图 3 可知,电泳后有 2 条条带,较大的为开环 pet32a,较小 500 bp 左右的片段为目的片段,证实表达载体构建成功。

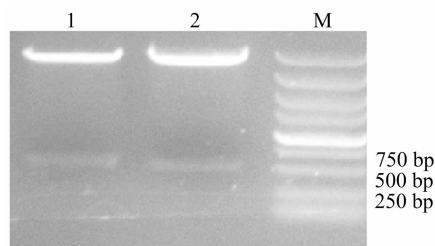


图3 重组载体双酶切验证

2.3 融合蛋白诱导表达及纯化

将构建好的原核表达菌株经 IPTG 诱导后,经 SDS - PAGE 蛋白胶检测,以加入 IPTG 之前菌体为对照,由图 4 可知,诱导后的菌体在 18 ku 左右有明显差异条带,符合预期大小;由图 5 可知,通过镍 (Ni) 柱纯化后得到较单一条带。

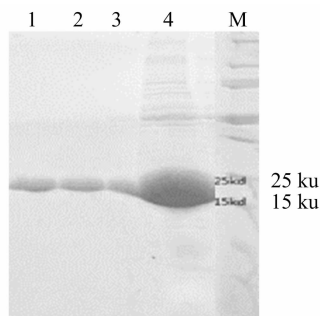


图4 表达产物 SDS-PAGE 结果

2.4 抗体制备检测

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 blot,结果见图 6。

3 讨论

由于 LvP53 ORF 有超过 1.5 kb 的 DNA 序列,编码蛋白分子量过大,不易表达,所以选择其中一段含有多个亲水位点的 (即含多个抗原表位) 序列。原核表达方法成熟且表达量大,通过原核表达获得高拷贝数的免疫活性的 P53 抗原。在

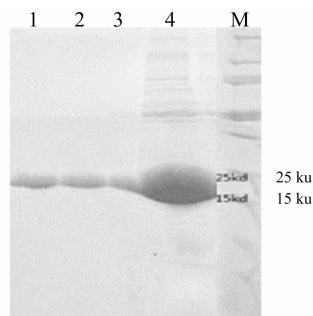


图5 融合蛋白的蛋白纯化结果



图6 多克隆抗体验证结果

PCR 获得目的片段和连接酶切位点时,一般方法必须经过 2 次 PCR。在本研究中,直接连上酶切位点和 HIS 标签,引物设计超过 20 bp,下游引物达到 53 bp,1 次 PCR,一步到位,节约了时间和试剂。不足的是 PCR 产物中有大量的引物二聚体,通过切胶回收目的条带,也能满足做下一步研究的需求。

参考文献:

- [1] 沈文英,阳会军,尹军霞. 南美白对虾的病害及防治研究现状 [J]. 水利渔业,2004,24(1):58-60.
- [2] 宋盛宪,古群红. 南美白对虾无公害健康养殖技术 [J]. 江西水产科技,2006(1):36-38.
- [3] Chanock S J, Benna J, Smith R M, et al. The respiratory burst oxidase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269 (40): 24519 - 24522.
- [4] 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.
- [5] Valko M, Leibfriz 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.
- [6] Serrano M A, Li Z, Mohan D, et al. DNA - PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53 - RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair [J]. Oncogene, 2013, 32(19):2452.
- [7] Pani G, Koch O R, Galeotti T. The p53 - p66shc - manganese superoxide dismutase (MnSOD) network: a mitochondrial intrigue to generate reactive oxygen species [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, 41(5):1002-1005.
- [8] 郭慧, 洗健安, 王安利. 亚硝酸盐对凡纳滨对虾血细胞毒性及 p53 基因表达的影响 [J]. 水生态学杂志, 2015(2):61-67.
- [9] Qian Z Y, Liu T, Liu Q, et al. p53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses [J]. Comparative Biochemistry and Physiology C - Toxicology & Pharmacology, 2014, 159(1):38-51.
- [10] 侯聪聪. 十足目甲壳动物顶体构架体及精子发生相关蛋白功能研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2015.