

日本囊对虾组织蛋白酶 B 基因的原核表达及纯化

黄媛¹ 王艺磊¹ 张子平² 岳亮¹ 冯建军¹ 郭松林¹ 林鹏¹

1.集美大学水产学院/农业部东海海水健康养殖重点实验室,厦门 361021;

2.福建农林大学水产系,福州 350002

摘要 采用原核表达的方法得到日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)组织蛋白酶 B 基因的重组蛋白。以日本囊对虾卵巢组织为试验材料,采用双标签(GST 和 His)的方法,用带有 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点以及 6×His-tag 的特异引物扩增 *Cathepsin B* 的开放阅读框,并连接至表达质粒 pGEX-4T-2 中。将重组表达质粒导入大肠杆菌 BL21 中,在 30 °C 条件下,用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)诱导 5 h 得到最佳诱导量,His 亲和柱进行纯化,纯化蛋白依次为 8、6、4、2、1、0 mol/L 尿素缓冲液中梯度透析,得到复性后可溶于水的重组蛋白,经 SDS-PAGE 检测,得到单一条带,其分子质量约为 63 ku。取冻干后的蛋白制备多克隆抗体,抗体效价达 50 000,经 Western blot 检测,同样可在 63 ku 处得到该条带,表明制备的组织蛋白酶 B(CB)多克隆抗体具有特异性,该抗体可特异识别 CB 蛋白。

关键词 日本囊对虾;卵巢;组织蛋白酶 B 基因;原核表达;多克隆抗体

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0086-07

组织蛋白酶大多属于木瓜蛋白酶家族(papain family)^[1],是蛋白水解酶中重要的一类,在生物体多种器官内广泛存在^[2]。人类基因组计划完成的十多年来,关于蛋白水解酶的研究有了很大的进展,其分类已逐渐明确,并建立了肽酶数据库^[3]。根据催化水解机制的不同,可以分为天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白酶和金属蛋白酶等 4 种类型^[4]。到目前为止研究最多的是半胱氨酸蛋白酶,其家族多种成员在人类基因组上的分子特征和结构已得到阐述^[5],如组织蛋白酶 B、F、H、K、L、O、S、V、W、X 和 T 等。组织蛋白酶 B(cathepsin B, CB; EC 3.4.22.1)同时具有肽链内切酶(endopeptidase)和羧基二肽酶(dipeptidyl carboxypeptidase)的活性^[6],又因其在人类癌症和炎症等疾病中超表达^[7-11],是脊椎动物中研究最为深入的细胞内酸性半胱氨酸蛋白酶。在虾蟹类及昆虫中,关于 CB 的研究,主要集中在卵子的形成、卵巢发育、胚胎幼虫的形成中^[12-16],但虾蟹类等 CB 的蛋白表达并未见报道。

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*),又称

日本对虾^[17],雌性个体生长速度明显高于雄性个体^[18]。笔者所在实验室前期已运用双向电泳技术鉴定出了日本囊对虾性腺差异蛋白——组织蛋白酶 B(MjCB)^[19],并利用 SMART-RACE 技术克隆其 cDNA 全长(GenBank: HQ328943.1),同时运用荧光定量 PCR 方法分析了日本囊对虾卵巢发育不同时期 CB 基因的表达情况^[15],该文参照性腺发育指数(gonad-somatic index, GSI)和切片观察将卵巢发育分为 4 个时期,其中 I 期 CB 基因表达量最高。笔者采取 CB 表达量最高的 I 期卵巢组织进行取样,运用双标签方法构建,成功构建了能够在 *E. coli* 中大量表达的 CB 原核重组表达质粒,并将此重组蛋白成功纯化、复性制备出特异的多克隆抗体,以期研究日本囊对虾在各组织中 CB 蛋白的表达情况提供基础资料,并为虾蟹类基因的原核表达方法构建提供一定的思路。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及主要仪器

1) 动物材料。日本囊对虾雌虾购自厦门市中埔

收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272685); 福建省自然科学基金项目(2012J01140); 福建省教育厅项目(JA12193)

黄媛, 硕士研究生。研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: yuanhuang2016@163.com

通信作者: 林鹏, 博士, 教授。研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: linpeng@jmu.edu.cn

水产市场,体长约 21 cm,体质量约 68 g。新西兰大白兔由厦门大学动物实验中心提供。

2) 试剂材料。RDP^[20] 是一种可以同时提取 RNA、DNA 和蛋白的试剂,为笔者实验室自行配置。*Taq* 酶等 PCR 常规试剂以及 T4 DNA 连接酶、*Eco*R I 和 *Not* I (快酶)等均购自 TaKaRa 公司。pGEX-4T-2 优化空质粒,由国家海洋局第三研究所馈赠。大肠杆菌 JM109 和 BL21 均为笔者所在实验室保存。DNase I 和 ThermoRevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo 公司。二抗羊抗兔 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程公司。胶回收试剂盒购自 Promega 公司。质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。88226 型 HisPur Ni-NTA Spin Columns 购自 Thermo 公司。ProteinA Resin 购自北京全式金生物技术有限公司。

3) 主要仪器。070-951 型 PCR 仪购自 Biometra 公司。3-30K 低温高速离心机购自 Sigma 公司。冷冻干燥机(冻干机)购自 Christ 公司。超声波破

碎仪购自 Scentz 公司;SDS-PAGE 电泳仪和 Western blot 电转仪购自 Bio-RAD 公司。

1.2 cDNA 模板的制备

解剖卵巢发育 I 期的日本囊对虾的卵巢组织,迅速冰上取样,并于液氮中过夜后于 -80 °C 保存。取已保存的卵巢组织,用 RDP 方法^[21] 提取卵巢总 RNA,经过 DNase I 处理后,按照 ThermoRevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书中的方法逆转录得到 cDNA 模板。

1.3 MjCB 原核表达特异引物的设计及其 ORF 的扩增

根据笔者所在实验室之前克隆的 MjCB 全长 cDNA 序列,结合所用原核表达质粒 pGEX-4T-2 的特点,用 Primer 5 软件设计原核表达引物(如表 1),并交由上海捷瑞生物工程有限公司合成。以上述 cDNA 为模板,扩增带双酶切位点的 MjCB 的 ORF 全长。PCR 条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s、61 °C 30 s、72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min;16 °C 冷却 5 min。

表 1 MjCB 原核表达引物设计

Table 1 MjCB prokaryotic expression primer design

| 引物名称 Primer name | 引物名称 Primer name | 引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3') |
|---------------------|---------------------|--|
| 正向引物 Former primer | MjCB-F | AGGAAT <u>CCC</u> ATGAGGGTTATTGTGGGTTTGTG |
| 反向引物 Reverse primer | MjCB-R | CGATGCGGCCGC [<u>GTGGTGGTGGTGGT</u>] GTGGTTCAGCTTGGGCAACCCAG |

注:下划线标注出 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点,方框标注出 6×His-tag 标签,加粗标注出起始密码子。Note: The underlines show the *Eco*R I and *Not* I restriction sites, block marks the 6 × His-tag labels, bold marks the start codon.

1.4 pGEX-4T-2-MjCB 表达重组质粒的构建

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,按照 Promega 胶回收试剂盒的方法纯化回收。胶回收的产物(带酶切位点的目的片段)和 pGEX-4T-2 空质粒同时进行 *Eco*R I 和 *Not* I 酶的双酶切。双酶切条件:37 °C 20 min;80 °C 20 min;20 °C 5 min。

琼脂糖凝胶电泳检测双酶切后的产物,回收双酶切后的目的片段和 pGEX-4T-2 质粒。利用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和 pGEX-4T-2 质粒,16 °C 过夜。将重组质粒转化入大肠杆菌 JM109 感受态细胞后,涂平板,挑选阳性克隆扩大培养,运用菌体 PCR 的方法检测,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测有条带的进行质粒提取并送至上海生工生物公司进行测序。

1.5 重组质粒的转化及大肠杆菌的诱导表达

参考 NCBI 中提交的序列进行比对,验证重组质粒序列,将比对正确的重组质粒 pGEX-4T-2-

MjCB 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。涂平板,挑选阳性单克隆于 1 mL LB 液体培养基(含 Amp)中,37 °C 230 r/min 摇床震荡过夜。运用菌体 PCR 的方法检测,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测有条带的即转化成功(可取转化成功的大肠杆菌 BL21 菌种保种,-80 °C 保存备用)。

将转化成功的菌液,以 1:100 比例于 LB 液体培养基(含 Amp)中扩大培养,37 °C 280 r/min 摇床震荡至 D_{600} 为 0.6~0.8 时停止培养,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)使其终浓度为 1 mmol/L,30 °C 250 r/min 摇床震荡,并分别在 3、4、5、6、7 h 时取出 1 mL 菌液,运用 SDS-PAGE 的方法确定最佳诱导时间。同时,以未转化的空质粒作为阴性对照。将未诱导菌液,以及分别诱导 3、4、5、6、7 h 的菌液,置于冰上进行超声波破碎:50 Hz,10 s,间隔 20 s,共 10 min。将破碎后的菌液于 4 °C 10 465 r/min 离心

5 min, 去上清, 并于沉淀中加入 300 μL PBS 重悬, 进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝 G250 染色 1 h, 脱色 1 h 后进行观察。

1.6 表达蛋白的纯化、复性和冻干

使用 HisPurNi-NTA Spin Columns (Thermo) 纯化重组表达蛋白 pGEX-4T-2-MjCB, 将其放于已处理过的透析袋中依次于 8、6、4、2、1、0 mol/L 尿素缓冲液中 (PBS 配置) 12 h 进行梯度透析使蛋白复性, 最后再放置于双蒸水中透析 2 次, 每次 16 h。取 10 μL 复性后的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。具体步骤为: ①制备 12.5% 的分离胶 (pH 8.8, 1.5 mol/L Tris-HCl) 和 3% 压缩胶 (pH 6.8, 1.0 mol/L Tris-HCl); ②单向蛋白电泳 (条件: 80 V 20 min, 然后换电压至 120 V 50 min); ③胶固定 1 h (固定液: 95% 乙醇 21 mL、100% 乙酸 5 mL、ddH₂O 24 mL); ④胶的清洗: 用 ddH₂O 将固定好的胶清洗 3 次, 每次 10 min; ⑤凝胶染色: 用 G250^[22] 对胶进行染色 1.5 h; ⑥清洗并观察结果: 用 ddH₂O 对染过色的凝胶清洗 3 次, 每次 20 min, 清洗的过程中蛋白条带会越来越清晰。检测具有单一目的条带的蛋白样品即为复性成功后的表达蛋白。最后将复性后的蛋白冻干为粉末状, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.7 多克隆抗体的制备及效价检测

取健康的雄性新西兰大白兔, 将冻干的表达蛋白 pGEX-4T-2-MjCB 加入弗氏完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射, 在此之前, 耳缘静脉取其血液作为阴性对照。此后每隔 14 d 进行 1 次加强, 加强针是冻干的表达蛋白加入弗氏不完全佐剂, 共 3 次。取血之前用 ELISA 的方法测效价。如果效价在 50 000 以上, 则处死大白兔, 动脉取血。血液 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 2 000 r/min 10 min 取上清即为抗血清, 分装至 200 μL EP 管中, 避免反复冻融, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.8 抗体的纯化和重组蛋白的 Western blot 分析

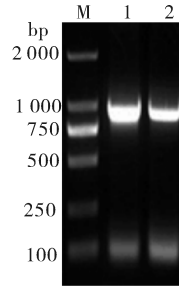
参照抗体纯化柱 ProteinIsoTM Protein A Resin 的说明书进行血清的纯化。取保种的大肠杆菌 BL21 菌液, 按照上述条件诱导 5 h, 获得重组表达蛋白, BSA 法测浓度, 取 10 μg 上述样品, 进行 SDS-PAGE 电泳; 对电泳后的凝胶进行转膜 (湿转: 100 V 电压转印 1 h), 预染的 Marker 可以显示转膜效果; 用 PBST (含 0.5% Tween 20) 缓冲液配置的 3% (ω/V) 牛血清蛋白 (BSA) 对膜进行封闭 (封闭条件: 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜); 将制备的抗体稀释适当浓度, 作为一

抗进行抗体的孵育 (条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h); 一抗孵育完成后用 PBST (含 0.2% Tween 20) 清洗 PVDF 膜 3 次, 第 1 次洗膜 5 min, 第 2 次 10 min, 第 3 次 15 min; 按照二抗说明书要求 (ECL 显色) 的比例稀释二抗到新配制的封闭液中得到二抗孵育液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 多次清洗后显影拍照。

2 结果与分析

2.1 cDNA 模板的制备和带双酶切位点 ORF 的扩增

以日本囊对虾卵巢 cDNA 作为 PCR 模板, 以特异引物扩增 ORF 的目的片段。扩增结果如图 1, 在 1 000 bp 左右处有一亮带, 与 MjCB 的 ORF 全长 996 bp 大小一致, 回收亮带胶。



M: Marker; 1, 2: MjCB 基因 PCR 产物 PCR products of MjCB gene.

图 1 MjCB 基因 ORF 的扩增

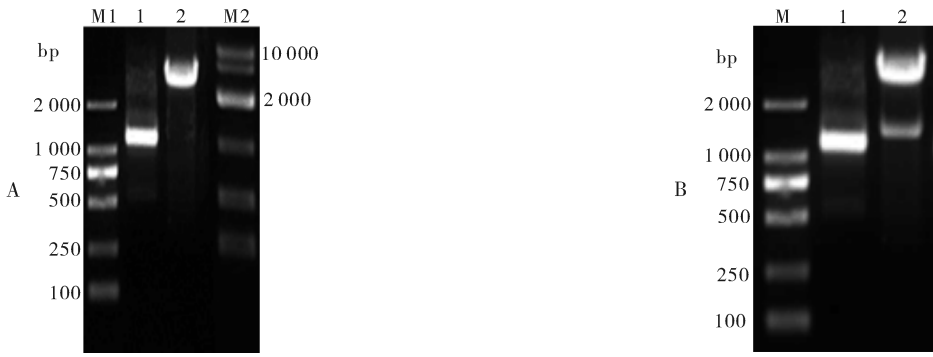
Fig.1 ORF amplification of MjCB gene

2.2 pGEX-4T-2-MjCB 表达重组质粒的构建

将胶回收的目的片段和 pGEX-4T-2 空质粒, 同时进行 EcoRI 和 NotI 酶的双酶切, 结果如图 2A, 目的片段出现在 1 000 bp 左右的位置, 空质粒出现在 4 900 bp 左右的位置。当酶切过后的空质粒和目的片段连接过后形成的重组质粒, 再次进行双酶切验证, 如图 2B, 对验证有目的片段插入的重组质粒进行序列测定, 测序结果正确。

2.3 pGEX-4T-2-MjCB 诱导表达条件的优化

在一定范围内 IPTG 诱导浓度的差异结果相差不会太大^[23], 本试验主要摸索了诱导表达时间的差异, 前期笔者所在实验室已鉴定出 MjCB 的表达以包涵体的形式存在于沉淀中^[19], 不同时间点诱导表达情况如图 3 所示。从诱导后第 5 小时, 蛋白表达含量稳定, 因此, 确定诱导最佳时间为 5 h。MjCB 预测分子质量为 37 ku, GST 标签为 26 ku, 所以重组蛋白分子质量约为 63 ku。从图 3 中可以明显看到与诱导前及空质粒相比, 重组蛋白有了大量表达, 且在预期分子质量的位置可以检测到。

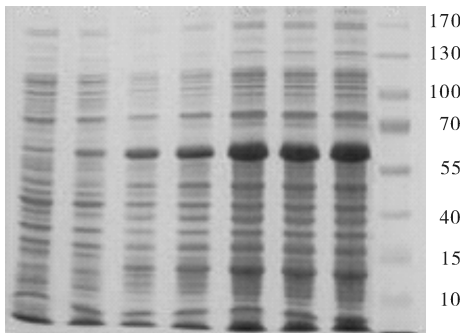


M: Marker; 1: *MjCB* 的 PCR 产物 Product of *MjCB* gene; 2: 已构建重组质粒 pGEX-4T-2-*MjCB* 的双酶切验证 Double digestion verification of recombinant plasmid pGEX-4T-2-*MjCB*.

M1, M2: Marker; 1: *MjCB* 的双酶切产物 Digested *MjCB*; 2: pGEX-4T-2 的双酶切产物 Digested pGEX-4T-2 plasmid.

图 2 目的基因和质粒的双酶切(A)以及重组质粒双酶切(B)的验证

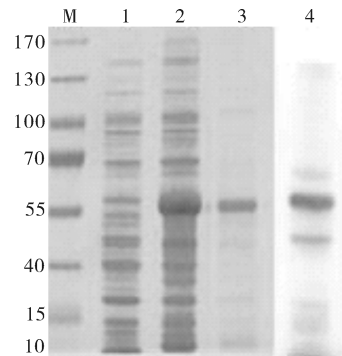
Fig.2 Double digestion of target gene and pGEX-4T-2 plasmid (A) and double digestion verification of recombinant plasmid (B)



1: 4T-2 空质粒的菌液 4T-2 plasmid without target gene; 2: 未诱导的重组菌液 Uninduced recombinant BL21 by IPTG; 泳道 3~7: 表示重组菌液诱导后 3、4、5、6、7 h 时的结果 The expressed protein of recombinant BL21 induced by IPTG at 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, respectively; M: Marker.

图 3 pGEX-4T-2-*MjCB* 重组蛋白表达 IPTG 诱导时间的优化

Fig.3 Optimization of induction time by IPTG for recombination protein's expression



M: Marker; 1: 4T-2 空质粒的菌液 4T-2 plasmid without target gene; 2: 重组菌液诱导 5 h 时 Recombinant bacteria induced by IPTG after 5 h; 3: 纯化后可溶的重组蛋白 *MjCB* Purified target protein; 4: 重组蛋白 *MjCB* 的 Western blot 检测 Western blot detect of the recombinant protein *MjCB*.

图 4 重组蛋白的纯化及 Western blot 检测

Fig.4 Purification and Western blot detection of *MjCB* protein

2.4 表达蛋白的纯化、复性和冻干

重组蛋白经过镍柱纯化后,经过尿素梯度脱水后已形成可溶性的蛋白,用 SDS-PAGE 的方法进行检测,得到单一条带,如图 4 中泳道 3 所示。诱导后 5 h 的目的蛋白有了大量表达,同时也有一些非特异的蛋白杂带,但是经纯化后只有 1 条目的蛋白。

2.5 多克隆抗体的检测

用酶联免疫吸附法检测多克隆抗体的效价,达到了 50 000。同时用 Western blot 的方法检测重组蛋白的特异性,结果如图 4 中泳道 4 所示,从而对所

制备多克隆抗体的特异性进行了验证。

3 讨论

对脊椎动物的研究发现, CB 广泛存在于多种组织中,具有一系列特殊的细胞功能^[24], 虾蟹类 CB 的研究目前集中在不同物种中 CB 基因的克隆以及在不同组织和应激条件下的表达情况,在不同物种中组织特异性并不完全相同。Stephens 等^[25]发现在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中, CB 除了游泳足和眼柄外,在其他组织中均有表达;而在中国明

对虾中, *CB* 在肝胰腺中的表达量是最多的, 其次是鳃和肌肉, 并且包含在白斑综合征病毒 (WSSV) 的免疫反应的通路中^[26]; 在日本囊对虾中, *CB* 基因除了在卵巢中高表达外, 其他组织中表达量都较低。尤其是精巢中, 基本不表达^[19]。但是对于 *CB* 在甲壳类中发挥各项功能的机制并不清楚。目前卵生动物中 *CB* 蛋白的表达, 在烟夜蛾 (*Helicoverpa assulta*)^[27]、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)^[12, 28] 和旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)^[29] 等昆虫中有报道。在虾蟹类等甲壳类动物中尚未见报, 如能大量表达出有活性的 *CB*, 将推动虾蟹类 *CB* 功能的研究。

通过对已知序列 *CB* 的多重比对发现, 亲缘性近的物种, *CB* 的 cDNA 比对结果相似性能达到 97% 以上。我们对已公布的甲壳类 *CB* 的基因结构进行分析发现: N 端均有 20 aa 左右的信号肽、前体结构域 propeptide_C1 和成熟肽, 且成熟肽由重链和轻链 2 条链组成。有报道称 *CB* 存在多种亚型^[30-31], 2006 年, 鲤中发现 2 种 *CB* 亚型^[32], 目前在日本囊对虾中我们只发现了 1 种 *CB* 序列。

笔者所在实验室曾多次尝试进行 *MjCB* 的表达, 改变诱导条件、切除信号肽区域等, 但是均没有表达出可溶解的重组蛋白。本试验采取手动添加 His 标签的方式, 利用镍柱纯化, 不同的咪唑浓度洗脱, 最后用梯度尿素复性得到可溶性的重组蛋白, 复性过程操作简单, 制备出的抗体并不影响 Western blot 对蛋白的检测, 对于包涵体的表达可以尝试本试验的方法。除了上述双标签的表达创新点外, 在 *CB* 原核表达的过程中, 引物的合成至关重要, 在引物上添加酶切位点时, 需要提前预测是否会发生移码突变; 在诱导表达阶段, IPTG 的终浓度、诱导表达的温度条件以及诱导表达的时间均需要设置梯度去优化最佳条件。Western blot 检测多克隆抗体特异性时, 封闭和 PBST 洗涤过程均是重要阶段, 操作不规范可能导致非特异条带的产生, 并非一定是多克隆抗体的问题。因此, 封闭液中 BSA (或脱脂奶粉) 的浓度应梯度调节摸索最佳浓度, BSA 浓度过低会导致封闭不完全, 产生非特异条带。PBST 溶液中, Tween20 的浓度也可以设置梯度, 摸索最佳, 其浓度过高或过低都会影响洗涤效果。虽然我们已成功表达出 *MjCB* 蛋白, 并制备了特异性的多克隆抗体, 可用于 *MjCB* 功能的后续研究, 但是原核表达要经过复性的处理, 尽管复性后成为可溶性的蛋白,

不影响 Western blot 实验对蛋白的检测, 但是复性的折叠并不能完全反映出该蛋白在生物体内的所有活性, 如果能在酵母体系中对 *MjCB* 进行真核表达, *MjCB* 活性蛋白的应用将会更容易推广, 因此, 笔者所在课题组对 *MjCB* 在毕赤酵母中的表达也进行了尝试, 成功构建了真核表达重组质粒, 并对其进行诱导表达, 最终有少量诱导表达产物生成, 但是由于检测方法的限制, 并未检测到此蛋白是否为表达所得目的蛋白。我们还将继续对其进行研究, 通过改变诱导条件、检测方法等实现其大量表达。

蛋白抗体的成功制备为其功能的研究提供了必要条件。人类 *CB* 蛋白在癌症、肿瘤以及炎症中的高表达, 已让其成为检测一些病症的标签^[33-34]。现在哺乳动物 *CB* 的抗体已商品化, 极大地促进了其应用范围。昆虫 *CB* 蛋白亦被证明广泛存在于卵、脂肪体、卵巢中, 在胚胎发育的过程中高表达, 并为其提供发育所需的必需氨基酸^[35-36], 因此, 预期以干扰 *CB* 基因的表达或采用 *CB* 抑制剂为目的进行抗病害 (杀虫灭卵) 的研究将有很大的应用前景^[27]。目前, 有关 *CB* 蛋白表达的研究在对虾中还未见报道, 本研究成功制备出特异的多克隆抗体, 可以为各组织中 *CB* 蛋白表达的检测提供基础, 为研究其在卵巢发育过程中的功能及其对虾的单一化养殖提供资料。

参 考 文 献

- [1] BARRETT A J, RAWLINGS N D, WOESSNER J F. Handbook of proteolytic enzymes [M]. Manhattan: American academic research press, 2012.
- [2] CYGLER M, SIVARAMAN J, GROCHULSKI P, et al. Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion [J]. Structure, 1996, 4 (4): 405-416.
- [3] RAWLINGS N D, BARRETT A J, BATEMAN A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors [J]. Nucleic acids research, 2012, 40 (D1): 343-350.
- [4] 曾广智, 谭宁华, 贾锐锐, 等. 组织蛋白酶及其抑制剂研究进展 [J]. 植物分类与资源学报, 2005, 27 (4): 337-354.
- [5] TURK V, STOKA V, VASILJEVA O, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers [J]. Biochimica et biophysica acta (BBA)-proteins and proteomics, 2012, 1824 (1): 68-88.
- [6] MCGRATH M E. The lysosomal cysteine proteases [J]. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1999, 28 (1):

- 181-204.
- [7] AGGARWAL N, SLOANE B F. Cathepsin B: multiple roles in cancer[J]. *Proteomics-clinical applications*, 2014, 8(5/6): 427-437.
- [8] 唐硕, 魏强. 组织蛋白酶 B 在非肿瘤疾病中的研究进展[J]. *西部医学*, 2008, 20(6): 1294-1295.
- [9] HUGHES S J, GLOVER T W, ZHU X X, et al. A novel amplicon at 8p22 - 23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1998, 95(21): 12410-12415.
- [10] EBERT M, KRÜGER S, FOGERON M L, et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis[J]. *Proteomics*, 2005, 5(6): 1693-1704.
- [11] FERNÁNDEZ P L, FARRÉ X, NADAL A, et al. Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma[J]. *International journal of cancer*, 2001, 95(1): 51-55.
- [12] 杜欣军, 邵红莲, 邵丁丁, 等. 棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原在大肠杆菌中的表达及纯化[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(2): 162-166.
- [13] BLOT N. 棉铃虫组织蛋白酶 B 组织分布与合成部位的研究[J]. *动物学研究*, 2001, 22(3): 242-245.
- [14] ZHAO X F, AN X M, WANG J X, et al. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development[J]. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 2005, 58(1): 39-46.
- [15] 程成, 林鹏. 日本囊对虾 Cathepsin B 基因在不同卵巢发育时期的表达[J]. *生物技术通报*, 2014, 11(1): 159-163.
- [16] CHO W L, TSAO S M, HAYS A R, et al. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor[J]. *Journal of biological chemistry*, 1999, 274(19): 13311-13321.
- [17] PEÁREZ F I, KENSLEY B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world[J]. *Bulletin of marine science*, 1998, 62(1): 299-301.
- [18] 邱高峰. 虾蟹类遗传育种学研究[J]. *水产学报*, 1998, 22(3): 265-274.
- [19] 岳亮. 日本囊对虾性腺差异的蛋白质组学及其差异表达基因 Cathepsin B 的分析[D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- [20] KIRKLAND P A, BUSBY J, STEVENS S, et al. Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins[J]. *Analytical biochemistry*, 2006, 351(2): 254-259.
- [21] 岳亮, 王艺磊, 张子平, 等. 日本囊对虾性腺蛋白质双向电泳的样品制备方法的改进[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2011, 16(4): 246-251.
- [22] CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [23] 邱高峰, 陈洁. 中华绒螯蟹精巢特异表达蛋白 DMRT-like: 抗体制备及免疫鉴定[J]. *水产学报*, 2013, 37(1): 63-69.
- [24] TURK B, TURK D, TURK V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers[J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-protein structure and molecular enzymology*, 2000, 1477(1): 98-111.
- [25] STEPHENS A, ROJO L, ARAUJO-BERNAL S, et al. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity[J]. *Comparative biochemistry and physiology B-biochemistry & molecular biology*, 2012, 161(1): 32-40.
- [26] LI X, MENG X, KONG J, et al. Molecular cloning and characterization of a cathepsin B gene from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2013, 35(5): 1604-1612.
- [27] 赵艳艳, 刘建兵, 罗梅浩, 等. 烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原基因的克隆、序列分析和原核表达[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(11): 1121-1128.
- [28] 董杜鹃, 扈进冬, 张新昌, 等. 棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原在毕赤酵母中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(2): 44-48.
- [29] 谢志宙. 旋毛虫组织蛋白酶 B 基因家族的克隆、表达及鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [30] PRATT D, ARMES L G, HAGEMAN R, et al. Cloning and sequence comparisons of four distinct cysteine proteases expressed by *Haemonchus contortus* adult worms[J]. *Molecular and biochemical parasitology*, 1992, 51(2): 209-218.
- [31] LARMINIE C G, JOHNSTONE I L. Isolation and characterization of four developmentally regulated cathepsin B-like cysteine protease genes from the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *DNA and cell biology*, 1996, 15(1): 75-82.
- [32] TAN Y, OSATOMI K, NOZAKI Y, et al. Occurrence of two distinct molecular species of cathepsin B in carp *Cyprinus carpio* [J]. *Fisheries science*, 2006, 72(1): 185-194.
- [33] THOMAS R, CHRISTOPH P, ACHIM K, et al. Differential impact of cysteine cathepsins on genetic mouse models of de novo carcinogenesis: cathepsin B as emerging therapeutic target [J]. *Frontiers in pharmacology*, 2012, 3: 133.
- [34] FEHRENBACHER N, JÄÄTTELÄ M. Lysosomes as targets for cancer therapy[J]. *Cancer research*, 2005, 65(8): 2993-2995.
- [35] ZHAO X F, WANG J X. Studies on the properties of the egg proteinases in *Helicoverpa armigera* [J]. *Acta entomologica sinica*, 1998, 41(1): 21-26.
- [36] XU Y S, KAWASAKI H. Isolation and expression of cathepsin B cDNA in hemocytes during metamorphosis of *Bombyx mori* [J]. *Comparative biochemistry & physiology part B biochemistry & molecular biology*, 2001, 130(3): 393-399.

Prokaryotic expression and purification of cathepsin B in shrimp, *Marsupenaeus japonicus*

HUANG Yuan¹ WANG Yilei¹ ZHANG Ziping² YUE Liang¹
FENG Jianjun¹ GUO Songlin¹ LIN Peng¹

1. Fisheries College, Jimei University/Key Laboratory of
Healthy Mariculture for the East China Sea,
Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China;

2. Department of Aquaculture, Fujian Agriculture and Forestry
University, Fuzhou 350002, China

Abstract The recombinant protein of cathepsin B in *Marsupenaeus japonicus* was obtained by prokaryotic expression. Opening reading frame of the *cathepsin B* gene was amplified with specific primer which contain *EcoR* I and *Not* I restriction sites and 6×His-tag from the ovary, connected with expression vector pGEX-4T-2 and introduced into *E. coli* BL21. The optimal induction was acquired at 5 h with IPTG concentration of 1 mmol/L at 30 °C. The recombinant protein was purified by His affinity column. A series of urea buffers (8 mol/L, 6 mol/L, 4 mol/L, 2 mol/L, 1 mol/L and 0 mol/L) were used for gradient dialysis. The soluble recombinant proteins were preserved in -80 °C after freeze-drying. The molecular weight of the protein was 63 ku measured by SDS-PAGE. The polyclonal antibody was prepared by using the freeze-dried proteins, and the antiserum titer of antibody was 50 000 by ELISA. The specificity of it can be detected by Western blot. The preparation of antibody laid the foundation for protein expression and gene function study of *cathepsin B*.

Keywords *Marsupenaeus japonicus*; ovary; *cathepsin B* gene; prokaryotic expression; polyclonal antibody

(责任编辑:边书京)