

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15040

建鲤组织蛋白酶 L 的原核表达、纯化鉴定及多克隆抗体的制备

李树红, 陈志光, 李冉, 李新, 李松, 陈秀华, 蒋然然, 李美良, 马璐阳

四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014

摘要: 对原核表达的重组建鲤组织蛋白酶 L(Cathepsin L, CAT L)蛋白进行尿素洗涤和 Ni-NTA 亲和层析纯化, 该目的蛋白经 300 mmol/L 咪唑洗脱为单一峰, SDS-PAGE 结合 TSK-GEL G2000SWxl 凝胶过滤高效液相色谱分析表明重组 CAT L 获得了高度纯化, 分子量约 28 kD, 纯度超过 95%。Z-Phe-Arg-MCA 底物测活法显示该重组 CAT L 表现为半胱氨酸蛋白酶活性, 能与其内源抑制因子 Cystatin 以 1 : 1 的摩尔比结合, 具有生物学活性。以纯化的重组 CAT L 蛋白免疫 Balb/C 小鼠获得抗血清, 经 ELISA 法检测获得的 CAT L 抗血清效价高于 1 : 512000; Western blotting 鉴定结果表明该抗体具有良好的特异性, 能够识别原核表达的重组 CAT L 蛋白。免疫组织化学分析结果表明, 该抗体还能识别建鲤小肠、肝胰脏、脾、背肌和心肌组织表达的内源性 CAT L 蛋白。因此可利用该抗体从蛋白水平检测 CAT L 在鱼类不同组织中的表达和分布情况。

关键词: 组织蛋白酶 L; 原核表达; 纯化; 鉴定; 多克隆抗体; 免疫组化

中图分类号: S965.1, TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0849-09

溶酶体组织蛋白酶 L(Cathepsin L CAT L)属于半胱氨酸蛋白酶超家族中最大的家族, 即木瓜蛋白酶家族(C1 家族)的成员, 具有典型的内肽酶活性^[1]。CAT L 可参与多种重要的生理过程, 如蛋白质水解、免疫、溶骨、细胞凋亡等^[2-3]。此外, 还与多种肿瘤的发生^[4]、骨质疏松^[5]、类风湿性关节炎^[6]、心脏疾病^[7]、肾病^[8]等重大疾病存在直接或间接关系。

目前, 关于组织蛋白酶在鱼类生理、病理中的作用研究也日益受到关注, 已有研究发现, 在 LPS 或病原微生物感染初期, 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)卵巢细胞^[9]、松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)肝、鳃、血、脾^[10]以及条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)肝和血细胞(LPS 和爱德华氏菌)^[11]中 CAT L 的 mRNA 转录水平上调, 推测 CAT L 可能参与鱼类的感染和免疫反应。哺乳动物溶酶体半胱氨酸蛋白酶可通过加工恒定链 Ii 和降解抗原肽而在

MHCII 类分子调节的抗原递呈中发挥重要作用, 而鲤(*Cyprinus carpio*)的组织蛋白酶 L 也在抗原呈递过程中参与对 MHC 恒定链 Iclp-1 的剪切过程^[12]。此外, 竹筴鱼(*Decapterus maruadsi*)卵母细胞生长初期, CAT L 活性量达到最高值, 而后下降^[13]。根据 CAT L 在胚胎发育早期的 mRNA 表达水平^[14]或活性水平^[15]推测其可能参与鱼卵卵黄蛋白的水解, 其对卵黄蛋白的水解程度及在孵化鱼卵中的活性会影响到季节性产卵量和幼鱼质量^[15]。在特定的生理时期和条件应激下, 鱼类各组织中 CATs 的表达水平和活性发生明显变化, 尤其在肌肉组织中的变化将通过影响死后鱼肉蛋白结构完整性, 导致质构特性的改变^[16], 进而影响经济鱼类的商品价值。例如, 大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)在产卵洄游期, 其白肌内的 CAT L 活性高于索饵洄游期 3~7 倍^[17], 此期间鱼肉易软化, 经济价值严重下降^[18]。大西洋鲑

收稿日期: 2015-01-22; 修订日期: 2015-05-22。

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0003); 四川省教育厅自然科学重点基金项目(10ZA052)。

作者简介: 李树红(1975-), 女, 副教授, 博士后, 研究方向为水产品加工理论与技术。E-mail: lish@sicau.edu.cn

(*Salmo salar*)在宰杀前饥饿 4 d, 再长时间施加拥挤胁迫, 发现其肌肉组织 CAT L 和 CAT B 基因表达量和活性均提高, 同时伴随肉质软化^[19]。可见, CAT L 与鱼肉肉质之间也存在内在关联。同时还有学者提出大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) CAT L 的 mRNA 含量水平, 与其冷藏期间鱼肉 TPA 和 pH 值的变化高度相关, 可作为评价冷藏期间鱼肉品质变化的衡量指标^[20]。然而上述研究, 都是从 CAT L 的 mRNA 或酶活性水平上进行的检测分析, 而进一步结合其蛋白表达水平及活性水平的时空变化规律, 来阐述其在鱼类体内的功能或作用机制的研究尚未见报道。其原因之一在于鱼类与哺乳动物 CAT L 的同源性相对较差, 而市售 CAT L 抗体多针对哺乳动物, 因此需要制备鱼类 CAT L 的专一性抗体才便于开展相关研究。

建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)是我国主要经济鱼类——鲤的主导品种, 具有遗传性状稳定、生长速度快、产量高的特点。经济鱼类的生产性能和品质, 不仅受遗传因素影响, 而且与营养、生理状态以及环境因素密切相关。鉴于上述 CAT L 在鱼类免疫、生长发育以及鱼肉肉质形成中的潜在作用和影响, 充分系统地研究建鲤 CAT L 的结构、活性特征和生物学特性, 从基因和蛋白水平上研究其表达分布的时空规律, 具有重要的理论意义。此外, 建鲤加工过程中产生大量废弃物如肝胰脏等各类脏器组织, 其中可能含有丰富的组织蛋白酶。对鱼类各组织中 CAT L 的 mRNA 表达水平进行研究, 发现其脏器等各个组织中都广泛分布 CAT L 活性^[9-11, 21-22], 尤其在某些鱼类脏器、腺体组织中的表达量明显高于肌肉。因此检测 CAT L 在建鲤组织中的分布和表达情况, 对于充分合理利用资源同样具有重要的现实意义。

为此, 本研究首先对原核表达的重组建鲤 CAT L 进行纯化鉴定, 制备了灵敏度高、特异性强的多克隆抗体, 并利用免疫组化技术对建鲤小肠、肝胰脏、脾、背肌和心肌组织中的 CAT L 的表达、分布进行了检测。以期为后续研究提供可行的免疫学检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)规格约 500 g/尾, 鲜活健康, 购于四川雅安农贸市场。雄性 Balb/C 小鼠, 体重(20±2) g, 由吉林大学动物实验中心提供。

转入建鲤 CAT L-pET-30a 的工程菌 *E.coli* BL₂₁ (DE₃), 纯化的建鲤重组 Cystatin 由四川农业大学食品学院水产加工理论与技术实验室保存。

异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)购自默克化工技术(上海)有限公司; Ni-NTA 琼脂糖亲和填料购自德国 QIAGEN 公司; BCA 蛋白检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究院; 中分子质量 Marker (14.4~94 kD)购自北京天根生化科技有限公司; 荧光合成肽 Z-Phe-Arg-MCA 购自美国 Sigma 公司; QuickAntibody Mouse 5W 标准鼠多抗制备佐剂购自北京康碧泉生物科技有限公司; 还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、TMB 显色液和 OCT 包埋剂购自北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司; S-P 超敏试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2 仪器与设备

Biologic Duo Flow 中高压层析系统、Mini Protein3 垂直电泳槽、PowerPac3000 电泳电源、Mini Trans-Blot 电转印槽、Gel Doc 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); TSK G2000 SWXL 凝胶过滤高效液相色谱柱(日本 TOSOH); LC-2010C HT 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU); Varioskan 全波长荧光/比色扫描读数仪(美国 Thermo Scientific 公司); ImageQuan ELC 发光仪(美国 GE 公司); CX21 光学显微镜(日本 Olympus 公司); 冰冻切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 建鲤 CAT L 的原核表达

建鲤 CAT L 的原核表达操作方法基本同李松等^[23]的方法, 不同之处在于重组菌株为转入 CAT L-pET-30a 的 *E.coli* BL₂₁(DE₃), 以及在 1:50 的扩大

培养过程中, 当 OD_{600} 为 0.6 时, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 继续诱导培养 2 h, 离心收集菌体沉淀, 用于后续操作。

1.4 重组 CAT L 的纯化

重组 CAT L 的纯化操作基本同李松等^[23]的方法, 不同之处在于采用 0.5 mol/L、1 mol/L、8 mol/L 的尿素溶液依次梯度洗涤, 将最终溶解于 8 mol/L 尿素溶液的上清液进行透析(含 2 mmol/L GSH, 0.2 mmol/L GSSG, 0.5 mol/L NaCl, 1 mol/L 尿素的 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5)。Ni-NTA 亲和层析纯化得到的目的蛋白, 经 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(pH 7.4)透析、浓缩, -80℃ 冻藏备用。

1.5 重组 CAT L 的凝胶过滤高效液相鉴定

纯化后的重组 CAT L 微滤后, 上 TSK-GEL G2000SWxl (7.80 mm×300 mm, 5 μ m 125 Å), 进样量 10 μ L, 流动相为含 0.1 mol/L Na_2SO_4 和 0.05% NaN_3 的 0.1 mol/L PBS, pH 6.7 洗脱, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 280 nm。凝胶过滤高效液相色谱分离的标准曲线制作同陈海等^[25]的方法。

1.6 重组 CAT L 的 Cystatin 抑制滴定曲线

首先参考 Barrett 等^[24]的 E-64 活性位点滴定法确定重组 CAT L 的摩尔浓度, 使其在酶反应体系中的物质的量达到 0.4 pmol。然后测定不同质量的纯化建鲤重组 Cystatin 对重组 CAT L 的抑制活性, 并绘制抑制滴定曲线。重组 CAT L 酶活测定参考 Barrett 等^[24]的方法, 以荧光合成肽 Z-Phe-Arg-MCA 为底物, pH 5.5, 40℃ 反应 10 min, 激发波长为 380 nm, 发射波长为 460 nm。

1.7 重组 CAT L 多克隆抗体的制备及间接 ELISA 法测定抗血清效价

重组 CAT L 多克隆抗体的制备及抗血清效价的测定, 参考李松等^[23]的方法。

1.8 免疫蛋白印记法检测原核表达的 CAT L

免疫蛋白印记法检测原核表达的 CAT L, 具体操作同李松等^[23]的方法。

1.9 免疫组织化学检测真核表达的 CAT L

免疫组织化学检测真核表达的 CAT L, 操作基本同李松等^[23]的方法。不同之处在于取

建鲤背肌、心肌、肝胰脏、脾和小肠组织进行测定。

1.10 数据处理及统计分析

采用 SPSS 19.0 数学软件进行统计分析, 计算各指标的平均值和标准差($\bar{x} \pm SD$)。

2 结果与分析

2.1 重组 CAT L 的表达纯化及鉴定

成功表达的重组蛋白 CAT L(图 1 泳道 2 中箭头所示水平位置), 经尿素洗涤去除了大部分杂蛋白(图 1 泳道 3), 经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析, 在 300 mmol/L 咪唑下洗脱, 呈现单一峰(图 2), 在 SDS-PAGE 中约 28 kD 处呈现单一条带(图 1 泳道 4)。高效液相色谱分析显示蛋白纯度较高(图 3), 在 18.3 min 处出现单一蛋白峰, 峰面积比例 96.3%。根据凝胶过滤高效液相上目的峰尖处的 V_e 与 V_0 的比值, 代入标准曲线回归方程测得重组蛋白

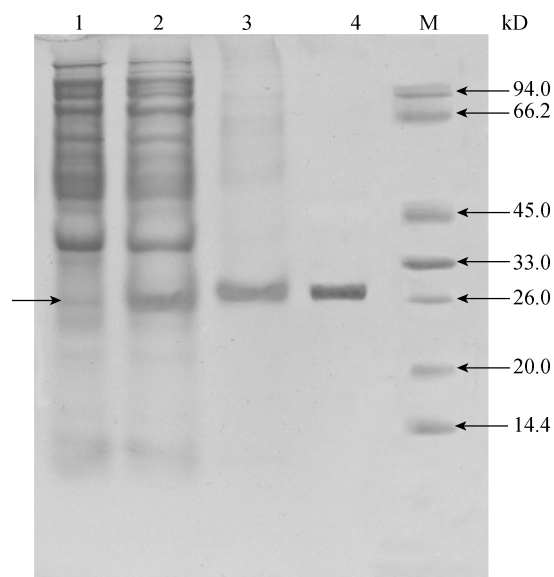


图 1 SDS-PAGE 检测重组 CAT L 的表达与纯化电泳图 M: 蛋白质分子量标准; 1: 转入 pET-30a 空质粒的 *E. coli* BL21 (DE₃) 全菌蛋白; 2: 转入 CAT L-pET-30a 的 *E. coli* BL21 (DE₃) 全菌蛋白; 3: 尿素洗涤后的样品; 4: Ni^{2+} -NTA 亲和层析后的样品。

Fig.1 Expression and purification of recombinant CAT L detected by SDS-PAGE

M: Standard protein marker; 1: The total protein of *E. coli* BL21 (DE₃) with transferred plasmid pET-30a; 2: The total protein of *E. coli* BL21 (DE₃) with transferred plasmid CAT L-pET-30a; 3: The sample washed with urea; 4: The sample purified with Ni^{2+} -NTA affinity chromatography.

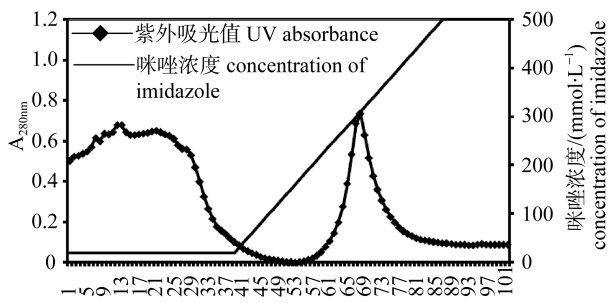


图 2 重组蛋白 CAT L 的 Ni^{2+} -NTA 亲和层析
Fig.2 Ni^{2+} -NTA affinity chromatography of recombinant CAT L

Cystatin 的分子质量约为 28.3 kD, 与 SDS-PAGE 的结果一致。

2.2 重组 CAT L 的 Cystatin 抑制滴定曲线

如图 4, 随着重组 Cystatin 加入量的增加, CAT L 残余活性逐渐下降。当 Cystatin 的加入量为 6 ng 时, CAT L 残余活性从 100% 下降到 36.30%, 此后趋于平缓。取滴定曲线的线性部分外推, 通过趋势线可以推测出, 完全抑制 0.4 pmol 重组 CAT L 时 Cystatin 的加量为 9.3 ng, 根据此前报道的建鲤重组 Cystatin 的分子量 21 kD^[25], 计算其摩尔质量约为 0.44 pmol, 因此, CAT L 可与其内源抑制因子 Cystatin 等摩尔比例结合。

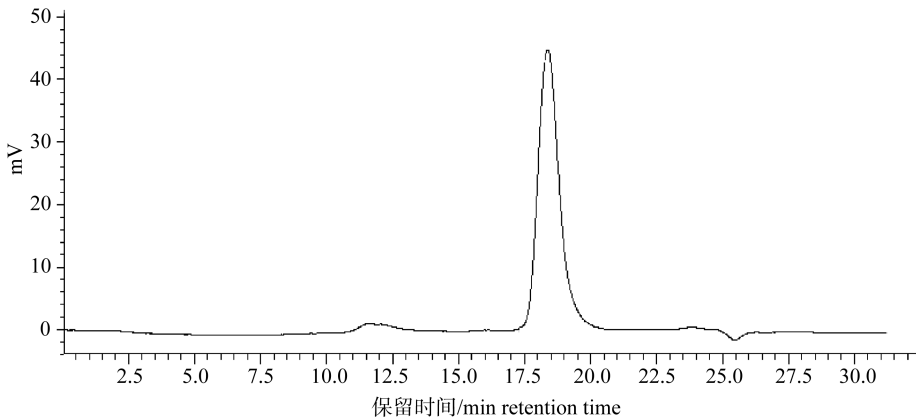


图 3 TSK-GEL G2000SWxl 凝胶过滤高效液相色谱鉴定重组 CAT L 蛋白
Fig. 3 Identification of recombinant CAT L protein by HPLC of TSK-GEL G2000SWxl

表 1 间接 ELISA 检测 CAT L 抗血清效价

Tab. 1 Titer detection of anti-CAT-L serum with indirect ELISA

项目 item	抗血清稀释倍数($\times 10^3$) dilution ratio of antiserum										
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
抗血清 A_{450} antiserum A_{450}	3.2970	3.0552	3.0157	2.6154	2.447	2.2920	1.9700	1.3330	1.2340	1.1900	1.0702
免疫前血清 A_{450} Serum A_{450} before immune	0.7363	0.7336	0.7558	0.6755	0.6727	0.6912	0.6710	0.6388	0.6352	0.6358	0.6358
空白对照 A_{450} blank control A_{450}	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335	0.1335
P(+)/N(-)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

2.3 CAT L 抗血清效价

由表 1 可见, ELISA 检测结果显示, 在 512000 倍稀释度下, P(+)/N(-)为“+”, 1024000 倍稀释度下, P(+)/N(-)为“-”, 根据“-”前一个“+”对应稀释倍数为最高效价, 可知 CAT L 抗血清效价达到 1 : 512000 。

2.4 CAT L 抗血清特异性识别原核表达的重组 CAT L

Western blotting 检测抗血清识别原核表达 CAT L 的特异性。如图 5 所示, 在转入 pET-30a 空质粒的全菌蛋白中, 未检测到 CAT L 存在。而转入 pET-30a-CAT L 的大肠杆菌, 经 IPTG 诱导后, 检测到了 CAT L 表达。此外, 层析前后的样品中, 也检测到非常强的 CAT L 信号, 且均为单一条带。结果表明, 该抗体可以特异性识别由原核表达的 CAT L, 具有较好特异性。

2.5 CAT L 抗血清特异识别建鲤内源性 CAT L 蛋白

免疫组织化学方法检测结果表明, 建鲤小肠、背肌、心肌、脾、肝胰脏均呈现不同强度的阳性染色(图 6 箭头所示), 说明该重组 CAT L 抗血清能特异识别真核表达的建鲤内源性 CAT L 蛋白, 可用于后续从蛋白水平上监测 CAT L 分布和表达的研究。

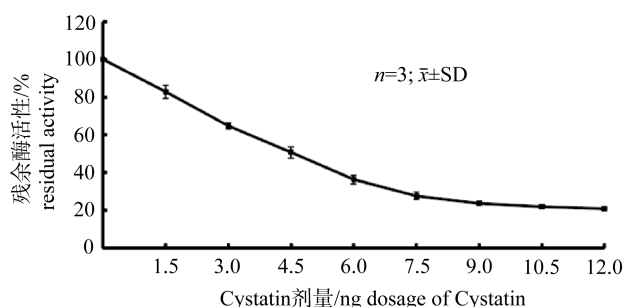


图 4 重组 CAT L 的 Cystatin 抑制滴定曲线

Fig. 4 Titration curve of recombinant CAT L with Cystatin

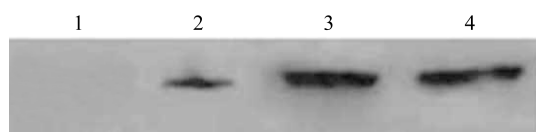


图 5 Western blotting 法检测 CAT L 的原核表达

1: 转入 pET-30a 空质粒的 *E. coli* BL21(DE₃) 全菌蛋白; 2: 转入 CAT L-pET-30a 的 *E. coli* BL21(DE₃) 全菌蛋白; 3: 尿素洗涤后的样品; 4: Ni²⁺-NTA 亲和层析后的样品。

Fig. 5 Prokaryotic expression of CAT L detected by Western blotting method

1: The total protein of *E. coli* BL21(DE₃) with transferred plasmid pET-30a; 2: The total protein of *E. coli* BL21(DE₃) with transferred plasmid CAT L-pET-30a; 3: The sample washed with urea; 4: The sample purified with Ni²⁺-NTA affinity chromatography.

3 讨论

本研究对建鲤 CAT L 成熟肽蛋白进行了原核表达和纯化鉴定, SDS-PAGE 结合高效液相色谱分析表明重组 CAT L 获得了高度纯化。荧光合成肽底物测活法显示, 重组 CAT L 的酶活性及其与内源抑制因子 Cystatin 的结合特性没有受到 His 标签的影响。类似地, 经原核表达的日本七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) CAT L^[21] 及青蛤 (*Cyclina sinensis*) CAT L^[26], 均表现出抑制人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)、人脐静脉内皮细胞(ECV304)和乳腺癌细胞(MA)的增殖, 抑制鸡胚尿囊膜血管新生^[21], 以及抑制藤黄微球菌的生物活性^[26]。本实验原核表达获得了有活性的重组建鲤 CAT L, 这对于后续深入研究其生物学活性特征和生理作用具有重要意义。

本研究利用重组 CAT L 蛋白制备了多克隆抗

体, 经 Western blotting 鉴定及免疫组化检测建鲤小肠、背肌、心肌、脾、肝胰脏各组织中 CAT L 的定位和表达, 得到理想的结果, 说明该多克隆抗体显示出了高效价、高特异性。Ahn 等^[27]亦通过 ELISA 和 Western blotting 法证明, 以牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 重组 CAT X 制备的多克隆抗体能够与纯化的天然 CAT X 和重组 CAT X 灵敏、专一性反应, 这对于深入研究将该抗体作为鱼类感染疾病中潜在的诊断或预后标志物具有一定的意义。另一方面, 水生动物和哺乳动物 CAT L 同源性相对较差, 而市售抗体多针对哺乳动物。因此, 目前缺乏灵敏度高、可专一检测鱼类 CAT L 的抗体, 为从蛋白水平上检测鱼类 CAT L 的分布和表达水平增加了一定难度。Aranishi 等^[28]报道利用纯化的分子量为 25~29 kD 的鲤 CAT B 制备的单克隆抗体, 不能与鼠 CAT B 发生免疫学反应, 但免疫印迹可以检测到该抗体可以与鲤、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)、黄鳍金枪鱼 (*Thunnus albacores*)、鲣 (*Katsuwonus pelamis*)、普通鲱 (*Pneumatophorus japonicus*) 的脾、肾和肝胰脏提取物发生明显的反应。而本研究高灵敏度、高特异性的建鲤 CAT L 抗体的成功制备, 弥补了其 CAT L 检测手段上的缺陷, 不仅可用于后续研究中对鲤科鱼类体内 CAT L 蛋白的定位和定量检测, 还有望用于鱼类相关疾病的免疫诊断, 因此具有一定的应用前景。

CAT L 可能参与机体的多种生理和病理过程, 但从蛋白质定位和蛋白质表达水平的角度阐述其在水生动物体内的功能或作用机制的研究较少。相对于根据 CAT L 水解活性进行的检测而言, 蛋白质定位检测最常用的免疫组化法具有全面、广泛的优势。免疫组化法与酶组化法的比较研究发现, 在人结直肠黏膜中, CAT B 蛋白的分布比 CAT B 活性分布, 更加广泛, 因为存在部分失活形式的 CAT B 蛋白(如前体或酶抑制复合物等)^[29]。卜兴江等^[30]利用原核表达的中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 重组 CAT L 制备了多克隆抗体, 并采用免疫印迹法检测了明对虾各组织中 CAT L 蛋白水平表达情

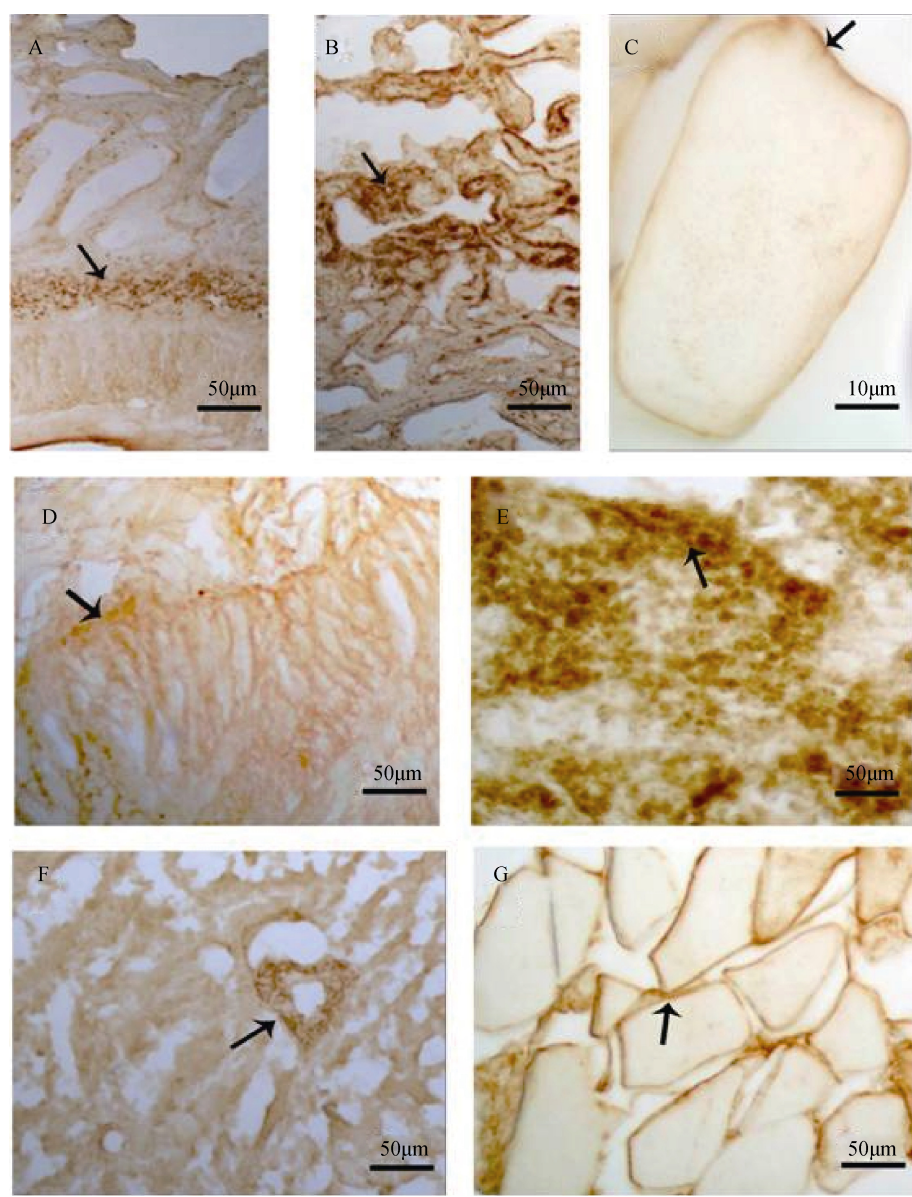


图 6 免疫组化检测抗血清识别真核表达的 CAT L

A. 小肠; B. 小肠绒毛; C. 骨骼肌细胞; D. 心肌; E. 脾; F. 肝胰脏; G. 骨骼肌. 箭头所示为阳性部位.

Fig. 6 The detection of antiserum against CAT L expressed in eukaryotic using immunohistochemistry
A. Small intestine; B. Intestinal villi; C. Skeletal muscle cell; D. Cardiac muscle; E. Spleen; F. Hepatopancreas; G. Skeletal muscle cell. The positive parts are indicated by arrows.

况; 对产卵洄游期大麻哈鱼白肌的免疫组化定位^[31]发现富含 CAT B 和 CAT L 活性的吞噬细胞可能参与了性成熟大麻哈鱼肌肉的深度软化。Zhou 等^[32]以刺参(*Stichopus japonicus*)类 CAT L 蛋白的多克隆抗体, 利用免疫组化法发现 CAT L 在其体表的表皮层分布比真皮层分布丰富得多, CAT L 分布密度与海参体壁自溶速率呈现正相关性。

目前, 关于基因和蛋白水平对建鲤 CAT L 生

理功能和作用机制的研究均未见报道。本研究利用原核表达制备了具有生物学活性的建鲤重组 CAT L 蛋白, 并制备了能够灵敏、特异地识别真核 CAT L 的多克隆抗体, 为从蛋白水平监测建鲤生长发育过程中及在不同应激条件下 CAT L 的时空表达模式, 进而探索 CAT L 在鱼类生理病理中的功能、作用机制, 奠定了良好的研究基础, 也为基因水平上的深入研究提供了科学可靠的对比性

的免疫学检查途径,具有重要的现实意义。此外,明确淡水经济鱼类加工废弃物中 CAT L 蛋白的具体分布情况、表达水平,对于正确、科学利用鱼类组织蛋白酶资源具有一定的指示作用和参考价值。

参考文献:

- [1] Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities[J]. EMBO J, 2001, 20(17): 4629–4633.
- [2] Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1824(1): 68–88.
- [3] Yang D H, Liu Y, Xiao R, et al. The structure and function of cathepsin L[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012(12): 1093–1099. [杨东辉, 刘宇, 肖蓉, 等. 组织蛋白酶 L 的结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012(12): 1093–1099.]
- [4] Skrzypczak M, Springwald A, Lattrich C, et al. Expression of cysteine protease cathepsin L is increased in endometrial cancer and correlates with expression of growth regulatory genes[J]. Cancer Invest, 2012, 30(5): 398–403.
- [5] Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, et al. Proteases and bone remodeling[J]. Cytok Growth Factor Rev, 2009, 20(1): 29–41.
- [6] Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers[J]. Clin Chim Acta, 2004, 342: 41–69.
- [7] Tang Q, Cai J, Shen D, et al. Lysosomal cysteine peptidase cathepsin L protects against cardiac hypertrophy through blocking AKT/GSK3 β signaling[J]. Int J Mol Med, 2009, 87(3): 249–260.
- [8] Sever S, Altintas M M, Nankoe S R, et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease[J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2095–2104.
- [9] Yeh H Y, Klesius P H. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, cysteine proteinases: Cloning, characterisation and expression of cathepsin H and L[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(2): 332–338.
- [10] Cui M X. Gene cloning, protein expression and expression analysis of Cathepsin B and L in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*)[D]. Jinan: Shandong University, 2012. [崔孟暄. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)组织蛋白酶 B 和 L 的基因克隆、蛋白表达与表达模式分析[D]. 济南: 山东大学, 2012.]
- [11] Whang I, De Zoysa M, Nikapitiya C, et al. Molecular characterization and expression analysis of Cathepsin B and L cysteine proteases from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(3): 763–772.
- [12] Kou C. Identification of carp MHC class II invariant chain (Ii) and proteolysis of Ii by cathepsins[D]. Beijing: Tsinghua University, 2009. [寇闯. 鲤鱼 MHC 恒定链的鉴定及组织蛋白酶对其剪切作用[D]. 北京: 清华大学, 2009.]
- [13] Aranishi F. Differential expression of ovarian cathepsins B, D and L during oocyte growth in scad[J]. J Reprod Dev, 2000, 46(5): 287–291.
- [14] Tingaud-Sequeira A, Cerdà J. Phylogenetic relationships and gene expression pattern of three different cathepsin L (CtSL) isoforms in zebrafish: CtSL is the putative yolk processing enzyme[J]. Gene, 2007, 386: 98–106.
- [15] Kestemont P, Cooremans J, Abi-Ayad A, et al. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period[J]. Fish Physiol Biochem, 1999, 21(1): 59–64.
- [16] Godiksen H, Morzel M, Hyldig G, et al. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Food Chem, 2009, 113(4): 889–896.
- [17] Yamashita M, Konagaya S. High activities of cathepsins B, D, H and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration[J]. Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem, 1990, 95(1): 149–152.
- [18] Yamashita M, Konagaya S. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1990, 56(8): 1271–1277.
- [19] Bahuauda D, Mørkøre T, Østbye T K, et al. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre- and post-rigor fillets exposed to short and long-term crowding stress[J]. Food Chem, 2010, 228(3): 602–615.
- [20] Zhao J, Guo Y J, Li J R, et al. Studies on the cloning and Stability of cDNA fragments of cathepsin L gene in *Pseudosciaena crocea*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 821–827. [赵进, 郭应建, 励建荣, 等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) Cathepsin L 基因 cDNA 片段的克隆与稳定性研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 821–827.]
- [21] Yang D H. Cloning, expression and function analysis of cathepsin L gene from *Lampetra japonica*[D]. Dalian: Liaoning Normal university, 2013. [杨东辉. 日本七鳃鳗组织蛋白酶 L 的克隆表达及功能分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2013.]
- [22] Wang Y J. Characterization, expression and phylogenetic

- analysis of amphioxus cathepsin, β -MSP and allantoicase genes[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005. [王勇军. 文昌鱼 cathepsin、 β -MPS 和 allantoicase 基因的特征、表达和进化研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.]
- [23] Li S, Yang L B, Zhang S Y, et al. Prokaryotic expression and identification of recombinant Cystatin of *Cyprinus carpio* var. Jian and preparation of its polyclonal antibody[J]. Journal of Jilin University: Medicine Edition, 2014, 40(1): 204–209. [李松, 杨立彬, 张舒岩, 等. 建鲤重组 Cystatin 蛋白的原核表达、鉴定及多克隆抗体制备[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2014, 40(1): 204–209.]
- [24] Barrett A J, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L[J]. Methods Enzymol, 1981, 80(41): 535–561.
- [25] Chen H, Jiang H Y, Wu R, et al. Prokaryotic expression and identification of recombinant Cystatin of *Hypophthalmichthys molitrix* and antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Food Science, 2014, 35(21): 133–138. [陈海, 姜海洋, 吴睿, 等. 鲢鱼重组 Cystatin 的原核表达、鉴定及对铜绿假单胞菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 133–138.]
- [26] Liu S M, Zhao T, Zhang H, et al. Analysis of expression and recombinant proteins activities of Cathepsin gene from *Cyclina sinensis*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2014, 45(1): 134–140. [刘诗萌, 赵婷, 张皞, 等. 青蛤(*Cyclina sinensis*)组织蛋白酶 L 基因的表达与重组蛋白活性分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(1): 134–140.]
- [27] Ahn S J, Kim N Y, Jeon S J, et al. Molecular cloning, tissue distribution and enzymatic characterization of cathepsin X from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Comp Biochem Physiol B, 2008, 151: 203–212.
- [28] Aranishi F, Hara K, Osatomi K, et al. Purification and immunological properties of Cathepsin B in carp *Cyprinus carpio*[J]. Comp Biochem Physiol B, 1996, 114(4): 371–376.
- [29] Bleeker F E, Hazen L G M, Koehler A, et al. Direct comparison of the sensitivity of enzyme histochemical and immunohistochemical methods: Cathepsin B expression in human colorectal mucosa[J]. Acta Histochemica, 2000, 102: 247–257.
- [30] Bu X J, Zhang X W, Sun Y D, et al. Recombinant expression and tissue distribution of cathepsin L from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 910–916. [卜兴江, 仇晓文, 孙允东, 等. 中国明对虾组织蛋白酶 L 的原核重组表达及其组织分布[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 910–916.]
- [31] Yamashita M, Konagaya S. Immunohistochemical localization of cathepsins B and L in the white muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in spawning migration: Probable participation of phagocytes rich in cathepsins in extensive muscle softening of the mature salmon[J]. J Agricult Food Chem, 1991, 39(8): 1402–1405.
- [32] Zhou D Y, Chang X N, Bao S S, et al. Purification and partial characterisation of a cathepsin L-like proteinase from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its tissue distribution in body wall[J]. Food Chem, 2014, 158: 192–199.

Prokaryotic expression, purification, characterization, and polyclonal antibody preparation of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) Cathepsin L

LI Shuhong, CHEN Zhiguang, LI Ran, LI Xin, LI Song, CHEN Xiuhua, JIANG Ranran, LI Meiliang, MA Luyang
College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: The recombinant Cathepsin L (CAT L) protein of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) expressed in prokaryotic cells was washed by a gradient of urea concentrations and then purified by Ni^{2+} -NTA agarose affinity chromatography. The target protein appeared as a single peak when eluted by 300 mmol/L imidazole in affinity chromatography. SDS-PAGE analysis and gel-filtration HPLC on a TSK-GEL G2000SWxl column revealed that recombinant CAT L was highly purified, and the molecular weight was about 28 kD with purity greater than 95%. The activity assay with Z-Phe-Arg-MCA as a substrate indicated that the recombinant CAT L could combine with its endogenesis inhibitor of Cystatin at a 1 : 1 ratio, and thus took on the biological activity of cysteine protease. Balb/C mice were immunized by the purified protein to obtain antiserum, and ELISA showed that the titer of CAT L antiserum was higher than 1 : 512000. Western blotting showed that the CAT L polyclonal antibody was highly specific for recognizing recombinant CAT L protein expressed in prokaryotic cells. Immunohistochemistry analysis indicated that this antibody also recognized endogenous CAT L protein expressed in the hepatopancreas, muscle, small intestine, heart, and spleen of Jian carp. Based on these results, the polyclonal antibody obtained in this study could be used to detect CAT L expression and distribution in different tissues of fish based on protein level.

Key words: Cathepsin L; prokaryotic expression; purification; characterization; polyclonal antibody; immunohistochemistry

Corresponding author: LI Shuhong. E-mail: lish@sicau.edu.cn