

中国明对虾组织蛋白酶 L 的原核重组表达及其组织分布

卜兴江^{1,2}, 仇晓文¹, 孙允东¹, 赵小凡¹, 王金星¹

(1. 山东大学 生命科学学院, 山东 济南 250100; 2. 安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 组织蛋白酶 L 属于半胱氨酸蛋白酶中的木瓜蛋白酶超家族, 在哺乳动物中它与抗原提呈、肿瘤入侵和转移、骨质吸收、细胞凋亡等许多生命活动有关。但对其在无脊椎动物中的功能了解的不多。从中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中克隆得到了组织蛋白酶 L 基因, 为了进一步研究组织蛋白酶 L 的组织分布及其功能, 对该基因进行了重组表达。将中国明对虾组织蛋白酶 L 基因的酶原片段亚克隆进原核表达载体 pET30a 中, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 再进行诱导表达, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳检测, 其分子量在 40 kD 左右, 与期望的中国明对虾组织蛋白酶 L 的分子量一致。表达产物形成包涵体, 经过对包涵体变性和复性, 并进行 His-tag 柱亲和纯化, 得到了纯化的蛋白。利用重组蛋白制备了兔抗血清。Western 实验表明, 组织蛋白酶 L 在中国明对虾的肝、胃、肠中有表达, 而在卵巢中没有表达。[中国水产科学, 2008, 15 (6): 910-916]

关键词: 中国明对虾; 组织蛋白酶 L; 原核重组表达; 组织分布

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)06-0910-07

蛋白酶 (EC3.4) 是指裂解肽链的所有酶类。根据其作用方式不同可以分为外肽酶 (Exopeptidase) 和内肽酶 (Endopeptidase), 内肽酶又可根据作用位点的催化基团不同分为: 丝氨酸蛋白酶 (Serine proteinases)、半胱氨酸蛋白酶 (Cysteine proteinases)、天冬氨酸蛋白酶 (Aspartic proteinases) 和金属蛋白酶 (Metallo proteinases)。其中半胱氨酸蛋白酶类又包括组织蛋白酶 L、B、H、N、S、M、T 等不同的种类^[1]。因其含有巯基又被称为巯基蛋白酶, 其活性中心含有活性必需的半胱氨酸残基, 与底物形成共价中间复合物, 具有普遍的蛋白水解活性。半胱氨酸蛋白酶主要存在于细胞质和溶酶体中^[2], 并且细胞内高度的还原环境对它们作用的发挥也非常重要^[3]。组织蛋白酶 L 不仅参与生物体内各种蛋白水解, 还参与许多重要的生命活动, 如抗原提呈、肿瘤入侵和转移、骨质吸收、细胞凋亡等^[4-7], 并且最近有报道称通过降低人组织蛋白酶 L 的活性能预防 SARS 病毒感染^[8]。此外, 组织蛋白酶 L 在食品加工中也有应用^[9]。尽管在高等动物中组织蛋白酶 L 的作用非常广泛, 参与机体

多种生理、病理过程, 备受学者的关注, 但在甲壳类动物中, 有关组织蛋白酶 L 的功能了解甚少, 值得进一步研究, 特别是组织蛋白酶 L 在体内要经过从酶原到活性酶的活化过程, 其活化机理尚不清楚。鉴于此本实验利用从中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中克隆得到的组织蛋白酶 L 的 cDNA (简称 *fc1*), 进行原核重组表达, 获得了重组的组织蛋白酶 L, 并制备抗体。一方面可以研究组织蛋白酶 L 在对虾体内的时空分布, 从蛋白水平上研究其在病原感染后的表达模式, 推测其在体内可能的功能; 另一方面可以对其活化机理进行初步探索, 以期为进一步的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 试剂、TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶等为 TaKaRa Biotechnology 公司 (大连) 的产品, DNA 胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒购于 Sangon (上海)。T₄DNA 连接酶为 Fermentas 公司的产品。琼脂糖电泳试剂、质粒提取试剂、细菌培

收稿日期: 2007-09-12; 修订日期: 2008-04-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770282); 国家高技术研究发展计划 863 计划资助项目 (2007AA09Z425, 2006AA100311).

作者简介: 卜兴江 (1976-), 男, 讲师, 研究方向为生化与分子生物学. E-mail: buxingjiang@163.com

通讯作者: 王金星. E-mail: jxwang@sdu.edu.cn

养试剂以及 SDS-PAGE 电泳试剂等分析纯试剂。大肠杆菌感受态菌株 DH5 α 、BL21 (DE3) 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 根据克隆得到的中国明对虾组织蛋白酶 L (简称 FCL) 酶原的 cDNA 序列和表达载体 pET30a 克隆位点两端的酶切识别序列,设计 1 对用于原核表达的特异引物 CalxF 和 CalxR,引物两端分别加入 *EcoRV* 和 *NotI* 酶切位点: CalxF:5' TAC TCA GATATC AGT CCC TCC ATC CGC CAG CAG 3'; CalxR:5' AAC TTG GCGGCCGC CTA CAC CAG CGG GTA GGA GGC CTG 3'。以中国明对虾肝胰腺 cDNA 为模板,以 CalxF 和 CalxR 为引物,进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 50 μ L,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 50 s 共 33 循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到大约 950 bp 的扩增产物,并将该条带在紫外线下切下,纯化回收 DNA 备用。分别用 *EcoRV* 和 *NotI* 双酶切 PCR 扩增的 *fcl* 基因和 pET30a 载体,37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。酶切后 *fcl* 基因用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收, pET30a 载体进行制备电泳,用胶纯化试剂盒回收酶切产物。将纯化后的两者用 *T₄* DNA 连接酶连接 16 $^{\circ}$ C 过夜。

1.2.2 *fcl*-pET30a 重组质粒的转化 将 *fcl*-pET30a 重组质粒转化 *E.coli* DH5 α , 以 CalxF 和 CalxR 为引物 PCR 筛选阳性菌株,挑取 PCR 筛到的阳性菌落,37 $^{\circ}$ C 振荡培养并提取质粒,经过 PCR 验证和 *EcoRV/NotI* 双酶切验证确认基因已插入。用验证正确的重组质粒 2 μ L 直接转化 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,涂布于 LB+Kana (卡那霉素) 平板,37 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养。

1.2.3 转化子的试表达 从上述平板上挑取 3 个分离较好的单菌落,分别放入盛有 5 mL LB+Kana 液体培养基的试管中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,次日取 50 μ L 过夜培养液加入到 5 mL LB+Kana 液体培养基中培养,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h 至 OD₆₀₀ 值在 0.8~1.0 之间,然后加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L,继续 37 $^{\circ}$ C 振荡培养诱导 4 h。诱导前,随机从一个样品中取出 0.5 mL 菌液,作为电泳检测时的对照。

表达结束后,各取出 0.5 mL 菌液,5 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,包括未诱导的样品,重悬于 100 μ L 去离子水中,以此为电泳样品作 12.5% 的

SDS-PAGE。根据电泳结果鉴定表达菌株。同时选取诱导表达为阳性的菌株进行不同诱导时间的表达实验,步骤如上,只是在加入 IPTG 诱导后,每隔 1 h 取 0.5 mL 菌液留样,直至诱导 6 h,进行 12.5% SDS-PAGE 检测。

1.2.4 重组蛋白 FCL 大规模表达与纯化 挑取表达菌株阳性单克隆在 LB+Kana 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养。次日,按照体积比 1:100 加入到 300 mL LB+Kana 液体培养基中培养,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h 后,OD₆₀₀ 值达到 0.8~1.0,再加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h,诱导前取出 0.5 mL 菌液作为诱导前对照样品。

诱导培养结束后,取出 0.5 mL 菌液作为对照,剩下的菌液在合适的离心管中 7 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,细胞重悬于 20 mL 预冷的 1 $\times$ PBS,并加入 Triton X-100 至终质量分数为 1%,超声波破碎细胞 (按仪器说明书操作),将破碎后的菌液 10 000 r/min 离心 15 min,分别收集上清液和沉淀,进行 12.5% SDS-PAGE 检测。参照 Kuhelj 等^[10]方法进行包涵体纯化,并用 His-Tag 柱亲和层析,获得目的蛋白。

1.2.5 重组蛋白 FCL 的活性检测 将纯化后的目的蛋白装入透析袋中,置于 100 体积透析液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 巯基乙醇,0.1 mol/L 乙酸钠, pH 3.6) 中透析 16 h 以上,以使其在酸性条件下,自我剪切活化。活性检测参照 Heussen 等^[11]方法进行,其基本方法与 SDS-PAGE 相同,区别在于分离胶中加入 1% 明胶作为蛋白酶分解的底物,上样前样品不需加热,电泳结束后胶在 2.5% TritonX-100 中轻摇 1 h,再于 0.2 mol/L 乙酸缓冲液 (pH 3.6) 中 37 $^{\circ}$ C 温浴 3 h 后,用考马斯亮蓝染色,最后脱色。

1.2.6 抗体制备与 Western 分析 抗体制备参照王来城等^[12]的方法:用健康雄性家兔,每周以的 100 μ g 重组蛋白 FCL 加 1 mL 福氏完全佐剂充分混匀,皮下分点注射。3 周后从耳缘静脉加强免疫 3 次,不加佐剂。3 周后开始取少量血清用重组表达的 FCL 与 TBS (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl) 梯度稀释的兔抗 FCL 血清进行琼脂糖双向免疫扩散检测。并进行免疫印迹分析。

取对虾组织用 8 倍体积 (V/W) 的 TBS 匀浆液 (含 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF) 匀浆,10 000 r/min 离心 5 min,上清液进行蛋白含量测定,按每个泳道 100 μ g 蛋白加样,12.5% SDS-PAGE 电泳。电泳结

束将胶用半干转移槽转硝酸纤维素膜 1 h, 将膜置于 10 mL 封闭液 (脱脂奶粉稀释于 TBS, 1%~5%) 中室温振荡封闭 2 h, 封闭结束将膜置于合适体积的 I 抗 (兔抗 FCL 的抗血清 1:100 稀释于封闭液) 中室温振荡过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 将膜置于合适体积的 II 抗 (羊抗兔 HRP1:10 000 稀释于封闭液) 中室温振荡封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; TBS 洗膜 10 min; 将膜置于 10 mL 显色液中于黑暗处发色, 当显色反应适当时, 用蒸馏水冲洗膜终止发色, 成像。

1.2.7 SDS-PAGE 分析 采用 Laemmli 等^[13] 的 SDS-PAGE 电泳方法进行。

1.2.8 蛋白质含量测定 参照 Bradford 方法 (又称考马斯亮蓝染色法) 进行^[14]。

2 结果与分析

2.1 *fcl* 基因扩增

将 *fcl* 基因通过生物软件翻译成氨基酸, 并经过 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 的软件分析, 表明对虾组织蛋白酶 L 基因编码的蛋白由信号肽、前体和成熟肽 3 部分组成 (图 1)。

MKELTVFACVYVAAVASPSIRQQWHNFKAEHGRHY
ASPQEERYRLSVFEQQQFIDDDHNARFENGVEYTFTL
QMNQFGDMTSEEFTATMNGFLNTPTRRPAGILRAD
DDETLPEKVDWRTKAVTPVKDQKQCGSCWAFSTTG
 SLEGQHFLKDGKLVSLSEQNLVDCSGKFGNMGCMG
 GLMDQAFRYIKENKGIDTESSYPYEAQDGKCRFEAS
 NVGATDTGFVDVEHGESALKKAVATIGPISVAIDAS
 QSTFHFYHKG VYHDDHCSSTMLDHGVLAVGYGTE
 ENGSDFWLVKNSWNTSWGDDGYIKMSRNQNNNC
 GIATQASYPLV

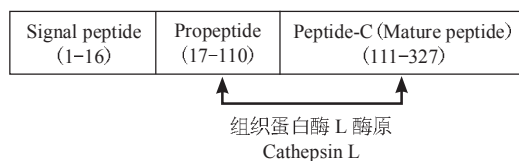


图 1 中国明对虾 FCL 氨基酸序列和结构域示意图
 双划线部分为信号肽; 单划线部分为前体; 未划线部分表示成熟肽。
 Fig.1 Amino acid sequence and structural domains of cathepsin L (FCL) from Chinese shrimp
 Double underline shows signal peptide; single underline shows propeptide; the others show mature peptide.

用 *fcl* 基因的特异引物 CalxF 和 CalxR 进行 PCR 扩增该蛋白酶原部分, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见到 1 条 950 bp 左右的扩增产物, 与 *fcl* 基因片段大小相符 (图 2a)。

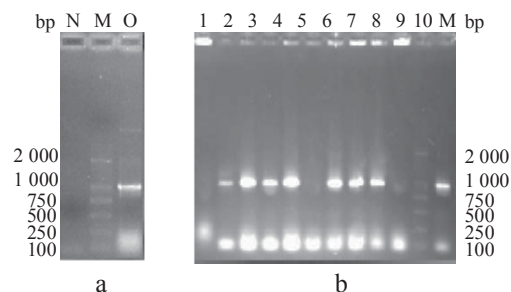


图 2 PCR 扩增 *fcl* (a) 及 *fcl*-pET30a 转化 *E. coli* DH5α 后的 PCR 筛选结果 (b)

N: 阴性对照; M: DNA 分子量标记 DL2 000; 0: PCR 扩增的 *fcl*; 1-10: 10 个单菌落。

Fig.2 Amplification of *fcl* by PCR (a) and screening of transformed *E. coli* DH5α by *fcl*-pET30a using PCR (b)

N: negative control; M: DNA Marker DL2000; 0: amplification of *fcl*; 1-10: different colonies of transformed *E. coli*.

2.2 *fcl*-pET30a 重组质粒的构建、转化和筛选

将 *fcl* 的 PCR 扩增产物用限制性内切酶 *Eco* RV 和 *Not* I 酶切, 连接到经过同样酶切的 pET-30a 质粒上, 转化 *E. coli* DH5α, 挑取单菌落用基因特异性引物进行 PCR 筛选, 得到 950 bp 的 PCR 条带 (图 2b)。说明这些菌株可能含有 *fcl*-pET30a 重组表达质粒。然后将 PCR 筛选到的阳性菌株扩增培养, 提取质粒进行 PCR 和 *Eco* RV 和 *Not* I 双酶切验证。同样都在约 950 bp 处有显示 (图 3), 表明目的基因已插入载体; 最后, 对表达质粒进行了测序验证, 结果表明所构建的 *fcl*-pET30a 重组表达质粒序列正确。

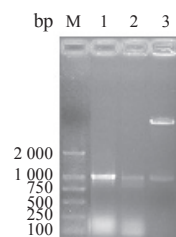


图 3 重组质粒 *fcl*-pET30a 的 PCR 验证及 *Eco*RV 和 *Not* I 双酶切验证

M: DNA 分子量标记 DL2 000; 1-2: 两个重组质粒的 PCR 验证; 3: 重组质粒的双酶切验证。

Fig.3 Identification of recombinant plasmid *fcl*-pET30a by PCR and digested recombinant plasmid *fcl*-pET30a with *Eco*RV and *Not* I

M: DNA Marker DL2 000; 1-2: identification of two recombinant plasmids *fcl*-pET30a by PCR; 3: identification of the digested recombinant plasmid *fcl*-pET30a with *Eco*RV and *Not* I.

从验证正确的 *fcl*-pET30a 重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 再挑取单菌落进行进一步验证和诱导表达。

2.3 重组蛋白酶 L (FCL) 诱导表达

挑取 3 个阳性菌落 [*fcl*-pET30a/*E. coli* BL21(DE3)] 进行小规模 (3 mL) 的诱导表达, 经过 SDS-PAGE 检测显示, 诱导后的样品在 40 kD 处比对照明显多出 1 条带。根据生物学软件计算, 去掉信号肽后的 *fcl* 基因编码 312 个氨基酸, 分子量约为 34.785 kD, 此外, pET30a 载体本身表达的分子量约为 5.306 kD。因此, 可认为 40 kD 的表达产物即为目的蛋白。同时也能看出不同菌株的表达情况 (图 4a)。利用 Labworks 系统软件进行相对含量分析, 表明不同表达菌株的目的蛋白表达量基本上没什么差别, 目的蛋白约占全菌总蛋白的 40%。此外, 不同诱导时间取样后经 12.5% SDS-PAGE 检测显示, 加入诱导物 IPTG 后 2~6 h 目的蛋白表达量较大 (图 4b)。为了使表达量达到最大并恒定, 选取 1 号菌株, 诱导时间为 4 h, 接着进行之后的大规模诱导表达。

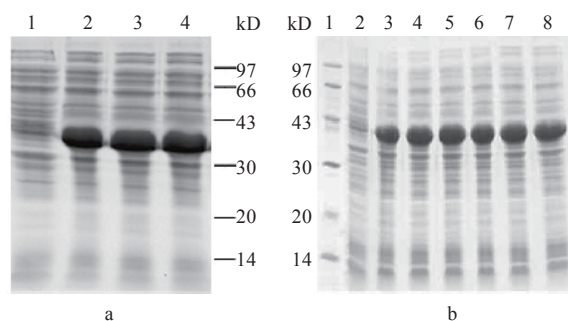


图 4 中国明对虾 FCL 的在大肠杆菌中的重组表达

a. 含有重组质粒的不同菌株的诱导表达; 1: 未诱导重组质粒; 2-4: *fcl*-pET30a/BL21 (DE3) 不同菌株 (重组菌株 1、2 和 3) 的诱导表达。
b. 含有重组质粒的同一菌株不同时间的诱导表达; 1: 分子量标准, 2: 未诱导; 3-8: *fcl*-pET30a/BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后 1~6 h。

Fig. 4 Recombinant expression of Chinese shrimp cathepsin L (FCL) in *E. coli*

a. Total proteins of the *fcl*-pET30a/BL21(DE3) induced by IPTG. Lane 1: non-induction control; lanes 2-4: total proteins of the *fcl*-pET30a/BL21(DE3) [recombinant BL21(DE3) 1, 2 and 3] induced by IPTG.
b. Inducing expression of rFCL in a recombinant *E. coli* at different time. Lane 1: Molecular marker; lane 2: non-induction; lanes 3-8: total proteins of *fcl*-pET30a/BL21 (DE3) induced by IPTG for 1 h to 6 h.

2.4 从包涵体中纯化重组蛋白

将 1 号转化子用摇瓶培养 300 mL, 离心收集菌体, 并进行超声波破碎。经过 12.5% SDS-PAGE 对大肠杆菌表达的上清液和沉淀进行分析, 上清液中未检测到目的蛋白, 发现 40 kD 的目的蛋白存在于的沉淀中, 说明目的蛋白是以包涵体形式表达的, 成为不溶性沉淀。经过方法中描述的包涵体变性和复性处理后, 目的蛋白绝大部分以可溶状态存在于复性后的上清液中, 经过 His-Tag 柱进行亲和层析, 可得到表达的目的蛋白 (图 5)。

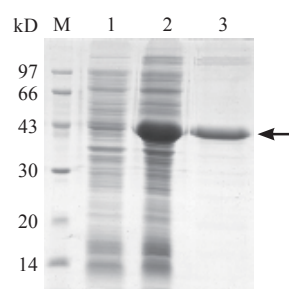


图 5 重组质粒 *fcl*-pET30a 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 后诱导表达的重组蛋白酶 L 的 SDS-PAGE 检测

M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导重组质粒; 2: IPTG 诱导表达; 3: 亲和层析纯化的 FCL 蛋白; 箭头示目的蛋白。

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant protein FCL from *E. coli* BL21(DE3) cultures containing the recombinant plasmids *fcl*-pET30a

M: standard protein; 1: non-induction control; 2: induced expression of the target protein by IPTG; 3: purified FCL. Arrow indicates target protein.

根据所测得的蛋白含量, 计算纯化 FCL 重组蛋白得率 (表 1), 由表 1 可以看出, 目的蛋白的得率为 24%。按此表推算, 每升培养菌株可纯化得到 FCL 重组蛋白 110 mg。

表 1 中国明对虾重组蛋白 (FCL) 的纯化得率 (300 mL)
Tab. 1 Purification yield of FCL from Chinese shrimp (300 mL)

步骤 Step	总蛋白含量 /mg Total protein	产率 /% Yield
细菌裂解液 Bacterial lysate	140	100
复性后上清液 Supernate of renaturation	90	64
His-Tag 纯化后 Purified rFCL	33.5	24

2.5 重组蛋白FCL的活性

通过应用原位水解的方法对在酸性条件下处理过的重组蛋白 FCL 进行了活性检测,结果未能检测到活性,说明重组蛋白 FCL 在酸性条件下没有发生自我剪切活化。

2.6 FCL的组织分布

利用纯化的 FCL 制备了兔抗血清。并用该抗血清对 FCL 在对虾各组织的表达分布用 Western blotting 进行了检测(图 6)。从图 6 中可以看出, FCL 在对虾的肝胰腺、胃和肠中有表达,而在卵巢中没有表达。同时,能发现 FCL 在表达的组织中以两种形式存在:无活性的酶原(分子量约 34.7 kD)和有活性的酶(分子量约 23.7 kD);从加蛋白质 Marker 的图上看出两者的分子量与推测的分子量基本一致,证明其就是 FCL。

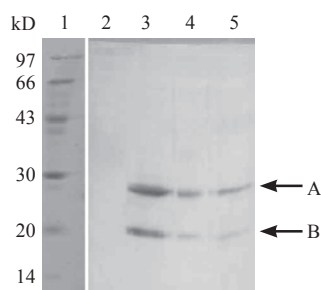


图 6 *fcl* 基因在中国明对虾各组织中表达的 Western blot 分析
1, 蛋白质分子量标准; 2, 卵巢; 3, 肝胰腺; 4, 胃; 5, 肠;

A 示 FCL 的酶原; B 示 FCL 成熟肽。

Fig.6 Western blot analysis of *fcl* gene in various tissues of chinese shrimp

L1, standard protein; L2, ovary; L3, hepatopancreas; L4, stomach; L5, gut.

A indicates procathepsin L; B indicates cathepsin L.

3 讨论

本研究从中国明对虾中克隆得到的 *fcl* 基因,其完整的阅读框全长为 987 bp,编码 328 个氨基酸,其中前 16 个氨基酸为信号肽,其余 312 个氨基酸构成 FCL 酶原。通过与 GenBank 中的同源序列比较,与凡纳滨白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 组织蛋白酶 L 相似性高达 91%。重组表达时去除了信号肽序列,只表达了 312 个氨基酸构成的酶原,目

的是为了探索该蛋白酶的活化机理和研究其组织分布。

组织蛋白酶 L 是一种具有内肽酶活性的半胱氨酸蛋白酶。哺乳动物的组织蛋白酶 L 的主要生理功能是在溶酶体内降解蛋白质。然而,最近的研究表明,组织蛋白酶 L 除了作为细胞内的蛋白质清道夫之外,还有多种生理功能,如抗原提呈、基质重塑、外肽酶成熟、骨质吸收、细胞凋亡等等^[4-6]。组织蛋白酶 L 还与许多疾病有关^[7-8]。

用制备好的兔抗 FCL 血清来检测不同组织中组织蛋白酶 L 的表达情况,通过 Western blot 实验发现,组织蛋白酶 L 在肝胰腺、胃和肠中有表达,且酶原与活性酶同时存在,但酶原的含量要高于活性酶的量,说明组织蛋白酶 L 在组织中大部分都是以酶原的形式存在,在机体需要时才会转变成活性酶。由于组织蛋白酶 L 主要存在于消化器官中,也说明组织蛋白酶 L 作为一种消化酶,在中国明对虾中的主要功能可能是消化食物。目前,在其他甲壳类动物中也证实了这一点^[20]。

由于本研究主要是针对 FCL (中国明对虾组织蛋白酶 L) 酶原的表达,因此,如果要检测蛋白酶的活性话,应首先对蛋白酶原进行活化。关于组织蛋白酶 L 的活化机理目前并不十分清楚。由于组织蛋白酶 L 在其成熟肽前面有一段前导肽,它主要起着抑制蛋白酶活性和帮助蛋白酶形成正确折叠的作用^[15-16]。因此,阐明蛋白酶活化机理的关键就在于阐明这段前导肽如何被剪切掉。有研究报道表明,组织蛋白酶 L 酶原活化是在酸性条件下酶原构象发生变化自我剪切活化的结果^[17],也有报道认为组织蛋白酶的活化需要其他蛋白酶的参与,如组织纤维溶酶原激活剂、组织蛋白酶 D 和胃蛋白酶等^[18]。但经过本实验探索,在酸性条件下活化该蛋白酶原,并没有获得活化态的蛋白酶,其原因之一可能是由于 pET30a 载体表达的是融合蛋白,增多了一段载体自身表达的蛋白,这对重组蛋白的活性可能会有影响。下一步的工作应利用蛋白酶多的一段载体蛋白剪切掉以确定该蛋白酶原能否活化。原因之二可能是该蛋白酶的活化有其他机制。因此对于组织蛋白酶 L 酶原的活化机制尚需做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Bond J S, Burler P E. Intracellular proteases[J]. *Ann Rev Biochem*, 1987, 56: 331-361.
- [2] 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.
- [3] Turk V, Bobt W. The cysteine protein inhibitor of cysteine proteinases[J]. *FEBS Lett*, 1991, 285 (2): 213-219.
- [4] Nakagawa T, Roth W, Wong P, et al. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus[J]. *Science*, 1998, 280(5362): 450-453.
- [5] Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, et al. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases[J]. *Neuroscience*, 1999, 91 (1): 233-349.
- [6] Furuyama N, Fujisawa Y. Distinct roles of cathepsin K and cathepsin L in osteoclastic bone resorption[J]. *Endocr Res*, 2000, 26 (2): 189-204.
- [7] Dohchin A, Suzuki J I, Seki H, et al. Immunostained cathepsins B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, 89 (3): 482-487.
- [8] Simmons G, Gosalia D N, Rennekamp A J, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acuterespiratory syndrome coronavirus entry[J]. *PNAS*, 2005, 102(33): 11 876-11 881.
- [9] Zhao G M, Zhou G H, Wang Y L, et al. Time-related changes in cathepsin B and L activities during processing of Jinhua ham as a function of pH, salt and temperature[J]. *Meat Science*, 2005, 70 (22): 381-388.
- [10] Kuhelj R, Dolinar M, Pungercar J, et al. The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies[J]. *Eur J Biochem*, 1995, 229 (2): 533-539.
- [11] Harrison R L, Bonning B C. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates[J]. *Anal Biochem*, 1980, 102: 196-202.
- [12] 王来城, 王金星, 赵小凡, 等. 家蝇防御素在大肠杆菌中的表达、纯化与抗体制备 [J]. *动物学报*, 2005, 51 (2): 327-334.
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [15] Carmona E, Dufour E, Plouffe C, et al. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteinases[J]. *Biochemistry*, 1996, 35 (25): 8 149-8 157.
- [16] Tao K, Stearns N A, Dong J, et al. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 311 (1): 19-27.
- [17] Jerala R, Zerovnik E, Kidric J, et al. pH-induced conformational transitions of the propeptide of human cathepsin L-A role for a molten globule state in zymogen activation[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(19): 11 498-11 504.
- [18] Georg L, Ralf F, Ewald B. Cathepsin b of schistosoma mansoni: purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by saccharomyces cerevisiae[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (3): 1 717-1 725.
- [19] Sakamoto S, Terada L, Lee Y C, et al. Efficient production of thermos protease aqualysin I in *Escherichia coli*: effects of cloned gene structure and two-stage culture[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45 (1-2): 94-101.
- [20] Laycock M V, Mackay R, M, Di Fruscio M, et al. Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*) [J]. *FEBS Lett*, 1991, 292(1-2): 115-120.

Recombinant expression and tissue distribution of cathepsin L from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

BU Xing-Jiang^{1,2}, ZHANG Xiao-Wen¹, SUN Yun-dong¹, ZHAO Xiao-fan¹, WANG Jin-xing¹

(1. School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China; 2. School of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Cathepsin L, a member of the papain superfamily of cysteine proteases, has been linked to tumor invasion and metastasis, antigen presentation, osteoclastic bone resorption and apoptosis in mammals, but the knowledge of cathepsin L from invertebrates remains underdeveloped. A cDNA of cathepsin L has been cloned from *Fenneropenaeus chinensis* (FCL). In order to analyze the function of FCL, it was recombinantly expressed in *Escherichia coli*. The fragment of FCL cDNA was subcloned into pET30a expression vector, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and then induced by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). SDS-PAGE analysis confirmed the expression of FCL and the molecular mass was about 40 kDa, which was in accord with the expected. However, the expressed product formed complete inclusion bodies in the cells. After denature with 8 mol/L urea and refolding by dialysis in Tris-HCl buffer, the soluble target protein was obtained, which could be purified by His Bind resin chromatography. The purified FCL was used as an antigen to immunize rabbits. After several injections, the polyclonal antiserum against FCL was obtained and used in immunoblotting experiments. Western blot analysis revealed that FCL was distributed in hepatopancreas, stomach and gut, but not in ovary. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (6): 910–916]

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; cathepsin L; recombinant expression; tissue distribution

Corresponding author: WANG Jin-xing. E-mail: jxwang@sdu.edu.cn

欢迎订阅 2009 年度《海洋渔业》

《海洋渔业》创刊于 1979 年,由中国科学技术协会主管、中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办。主要刊载海洋水产资源与捕捞、海水增养殖、渔业水域生态环境保护、水产品保鲜与综合利用、水产生物技术、渔业机械与仪器等方面的水产基础理论研究和水产应用基础研究的论文、综述和简报,读者对象主要为海洋水产科技工作者、水产院校师生和渔业行政管理人员等。

《海洋渔业》作为学术期刊于 2006 年被“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)收录,并先后被《中国期刊全文数据库》(CJFD)、《万方数据—数字化期刊群》、《中文科技期刊数据库》、联合国《水科学和渔业文摘》(ASFA)等期刊数据库收录。

《海洋渔业》为国内外公开发行人,国内统一刊号:CN31—1341/S,国际标准刊号:ISSN1004—2490,邮发代号:4—630。季刊,大 16 开,96 页,逢季中月 25 日出版。定价:14 元/册。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 300 号

电话:021-65680116, 021-65684690×8048

电子信箱: haiyangyuye@126.com, haiyangyuye@tom.com

邮编: 200090,

传真: 021-65683926,

网址: www.eastfishery.ac.cn