

中国明对虾 *Kazal* 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 (*Fc-Kazal*) 的重组表达及活性分析

黄明^{1,2#}, 刘逸尘^{1,2#}, 张亦陈^{1,2}, 孙妍², 孙金生^{1,2,3*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387;

2. 天津市细胞遗传与分子调控重点实验室, 天津 300387;

3. 天津市水产养殖病害防治中心, 天津 300221)

摘要: *Kazal* 型丝氨酸蛋白酶抑制剂可以通过精确调控丝氨酸蛋白酶的活力, 在生物体的防御应答等众多生物过程中发挥重要作用。以前期克隆的中国明对虾 *Kazal* 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 (*Fc-Kazal*, GenBank 注册号为 DQ318856) 为基础, 对其功能结构域进行序列比对和进化分析; 组织表达分析结果表明, 该基因在血细胞、鳃和淋巴器官等组织中高水平表达, 而在眼柄、神经和肌肉中无表达; 利用原核表达系统对该基因成熟肽区域成功进行了重组表达, 纯化后的目的蛋白最终得率为 0.4 g/L 培养液; 活性分析结果显示, 复性后的 r*Fc-Kazal* 对鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌、苏云金芽孢杆菌有明显的抑菌作用。

关键词: 中国明对虾; *Kazal* 型丝氨酸蛋白酶抑制剂; 先天免疫; 重组表达; 抑菌活性

中图分类号: S 917; Q 784; Q 786

文献标志码: A

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SPI) 广泛存在于生物有机体内, 它们在消化、血液凝结、酚氧化酶原激活系统、补体系统、免疫反应等多种生理过程中发挥着重要作用, 在这些过程中, SPI 主要起着调控丝氨酸蛋白酶 (SP) 活力的作用。SP 和 SPI 一起参与蛋白酶级联反应, 如果蛋白酶的活力失去控制, 那么对细胞和机体都将是致命的, SPI 在精确调节蛋白酶活力方面发挥了重要作用, 它们可以防止蛋白酶的过量激活, 从而避免宿主组织的自身损伤。其中 *Kazal* 家族、*Kunitz* 家族、 α -巨球蛋白家族和 *Serpin* 家族被证明在免疫反应中发挥重要作用^[1-3]。*Kazal* 型 SPI 是 *KAZAL* 等^[4]首次发现胰蛋白酶抑制剂 (PST1) 后命名的, 它们是一类低分子量的含一个到多个重复 *Kazal* 结构域的蛋白, 典型的 *Kazal* 结构域由 50 ~ 60 个氨基酸残基组成, 其中 6 个半胱氨酸残基以 1-5/2-4/3-6 的模式形成 3 对二硫键。在第二个半胱氨酸

残基之后的第二个氨基酸位点被称为 P1 位点, 此氨基酸则被称为 P1 残基^[5], 该残基直接决定着 *Kazal* 结构域的靶酶抑制特性。

目前, 在不同的动物中已有部分 *Kazal* 型 SPI 被分离纯化, 并研究了其结构和功能, 如: 3 个 *Kazal* 型结构域构成的鸟类卵类粘蛋白 (ovomuroid)^[6], 寄生虫刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 中具有 4 个 *Kazal* 结构域的 TgPI-1, 能够抑制胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶的活性, 对抗宿主肠道产生的消化性蛋白酶^[7], 家蚕 (*Bombyx mori*) 中发现了含有 3 个结构域的 *Kazal* 抑制因子 BmSPI^[8], 玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*) 中仅含有一个 *Kazal* 型结构域的胰蛋白酶抑制剂^[9], 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 中具有 6 个 *Kazal* 结构域的 AISPI^[2] 以及栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的含十二个结构域的抑制因子 CfKZSPI^[10]。目前, 在甲壳动物

收稿日期: 2011-04-19 修回日期: 2011-06-24

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30871907, 30901119, 30901094); 天津市科委 (10JCZDJ13200, 10JCYBJC09200, 09JCYBJC15000)

作者简介: 黄明, 刘逸尘为同等贡献作者

通讯作者: 孙金生, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

中也已报道了一些 Kazal 型 SPI,发现存在于血淋巴中的 Kazal-SP 是主要的免疫防御系统调节因子,推测它们在先天免疫系统中起着重要的作用。宽大太平螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)的血细胞中一个含有 4 个 Kazal 结构域的 SPI,对胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶有抑制作用^[11];在斑节对虾(*Penaeus monodon*)的血细胞中发现了一个含 5 个 Kazal 结构域的抑制剂 SPIpm2,该抑制剂对枯草杆菌蛋白酶有抑制活性,推测其可能在病原细菌的感染过程中发挥免疫作用^[12];最近在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的肝胰腺中发现了一个具有 9 个 Kazal 结构域的抑制剂(FcSPI-1),推测其不仅在病原微生物侵染时发挥作用,而且也参与自身蛋白酶活力的调节^[13]。到目前为止,围绕水生动物 Kazal 型抑制剂虽然开展了一些研究,但主要都是都集中在基因的克隆、组织表达分析上,部分研究开始关注其生物学活性,但对其精确功能和在免疫应答过程中的调节机制研究尚不清楚,针对这方面的工作,通过体外重组表达获得目的蛋白或者利用 RNA 干扰技术研究相关功能和调节机制都是较可行的探索。我们在前期工作中发现,特定存在于血细胞中的 *Fc-Kazal* 在转录水平参与由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引发的先天免疫应答过程^[14],本研究在此基础上分析了该基因的结构域特点和组织表达特征,对其成熟肽区段进行了重组表达研究,并对重组蛋白的生物学活性和潜在功能进行了探讨,为了解该基因在中国明对虾先天免疫应答过程中的作用机制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物、菌株、质粒 中国明对虾(体长 8~10 cm)购于天津神堂水产育苗养殖有限公司,实验前在水族箱中充气暂养 7 d,使其适应实验室内养殖环境;菌株 DH5a 为本实验室保存,表达菌株 BL21(DE3)plysS 购于北京天根生化科技有限公司;致病菌鳃弧菌、哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌、苏云金芽孢杆菌由天津市水产养殖病害防治中心提供;克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pCR[®] T7/NT

TOPO[®] TA 由中国科学院海洋研究所李富花研究员馈赠。

试剂 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen);限制性核酸内切酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker (TaKaRa);质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶纯化试剂盒、异丙基-B-D-硫代半乳糖苷(上海生工生物工程有限公司);蛋白 Marker (Fermentas);营养肉汤培养基(北京双旋微生物培养基制品厂);营养琼脂培养基(北京双旋微生物培养基制品厂);其它试剂均为国产或进口分析纯产品。

仪器 PCR 仪 (Bio-Rad); BioLogic DuoFlow 层析系统 (Bio-Rad);恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);台式冷冻离心机 (Eppendorf);8 mm 外径牛津杯(上海黄海药检仪器销售有限公司)。

1.2 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

从健康的中国明对虾第一腹节基部腹血窦抽取血淋巴,经离心获得血细胞。另分离中国明对虾的鳃、眼柄、肌肉、心脏、淋巴器官、肝胰腺、神经、血细胞和肠道,迅速放入液氮中,各组织与获得的血细胞一起参照 TRIzol 说明书的方法提取总 RNA。提取的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪 (Bio-Rad) 进行定性和定量检测, -80 °C 保存备用。以 2 μL 血细胞总 RNA 为反转录模板, poly (T) 引物 (AOLP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16(A/C/G)-3') 为反转录引物,合成第一链 cDNA。

1.3 *Fc-Kazal* 基因 ORF 区的生物信息学分析

将预测的 *Fc-Kazal* 成熟肽氨基酸序列利用 BlastP 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行同源比对分析,采用 Clustal X 和 MEGA 4.0 软件对其进行多序列比较和聚类分析,系统树采用 Neighbour-Joining 方法构建。

1.4 组织表达分析

将中国明对虾 9 种组织的 RNA 反转录成 cDNA,反应条件与上述相同。以各组织 cDNA 为模板扩增 β -actin 的部分序列,引物为 β -actin f (5'-AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC-3'), β -actin r (5'-TTCTCCATGTCGTCGCCAGT-3'), 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 26 个循环; 72 °C 保温 10 min。用调整好的各个组织 cDNA 模板量来扩增

Fc-Kazal 序列片段,引物为 *Fc-Kazal-f* (5'-AACCAAACGAAGATGGCTCA-3'), *Fc-Kazal-r* (5'-TTGAATTGATCACATGGTGCATA-3'), 反应条件:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,26 个循环;72 °C 保温 10 min。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.5 *Fc-Kazal* 的表达和纯化

表达载体的构建 据 *Fc-Kazal* (GenBank: DQ318856) 序列和 pCR[®] T7/NT TOPO[®] TA 表达载体序列特征,设计原核表达引物 *Fc-Kazal-Ef* (5-TAAGGATCCAACCCCTGTCTCTGGCTCCGGA-3) 和 *Fc-Kazal-Er* (5-AGCAAGCTTCGAATTCGCCCTTATCAATATCCCTTCTTTATAAC-3), 上游引物 5'端含 *Bam*H I 酶切位点,下游引物 5'端含 *Hind* III 酶切位点。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增其基因成熟肽区域。将测序正确的阳性克隆的质粒与表达载体质粒 pCR[®] T7/NT TOPO[®] TA 同时用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段及表达载体质粒,并用 T₄ DNA 连接酶连接,构建重组表达质粒 pCR[®] T7/NT TOPO[®] TA-Kazal,转化大肠杆菌 BL21 (DE3) plysS 感受态细胞(具体操作参照 pCR[®] T7/NT TOPO[®] TA Expression Kit),将阳性克隆进行测序(北京华大基因生物公司)。

重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析 取 1 mL 保种菌体接入 20 mL 新鲜的 LB 培养液中(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37 °C,220 r/min 培养至 OD_{600 nm} 达到 0.6~0.8 时,取出 1 mL 未诱导的菌液,其余的菌液在 37 °C、220 r/min 条件下以终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 继续诱导培养 6 h,在 0.5、1、2、3、4、5、6 h 分别取样(每次 1 mL),将收集到的样品在 4 °C,10 000 r/min 条件下离心 5 min,菌泥保存于 -20 °C 待用。在每个样品中加 100 μL 上样缓冲液(1 mol/L pH 6.8 Tris-HCl,1% 溴酚蓝,0.154 g DTT,10% SDS,10% 甘油)处理,沸水浴裂解菌体,将收集到的样品进行 12% SDS-PAGE 电泳检测,以确定蛋白的最佳诱导时间。

胶内酶解与 LC-ESI-MS 鉴定 将 SDS-PAGE 胶上的目的条带切下,利用胰蛋白酶进行胶内酶解,取 25 μL 酶解后的样品进行离子阱质谱分析(LCQ DECA XP^{plus} MS, ThermoFirmigan,

USA),利用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对。

重组蛋白的分离纯化及复性 37 °C 大量培养保种菌体至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 5 h 后,10 000 r/min,4 °C 离心 10 min 收集菌体,按 1 g 湿菌 10 mL 破碎缓冲液(含有 1% TritonX-100,2 mmol/L EDTA)的比例重悬菌体,冰浴超声破碎 3 次。4 °C,10 000 r/min 离心 10 min 收集包涵体;用包涵体洗涤液(300 mmol/L KCl,50 mmol/L KH₂PO₄,5 mmol/L Iminazole,1 mol/L Urea,pH 8.0)洗涤 3 次,得到初步纯包涵体。上述洗涤获得的包涵体溶于包涵体裂解液(300 mmol/L KCl,50 mmol/L KH₂PO₄,5 mmol/L Iminazole,8 mol/L Urea,pH 8.0),置于振荡器上振荡 20 min,4 °C,10 000 r/min 离心 10 min,取上清,应用 BioLogic DuoFlow 层析系统(Bio-Rad)对目的蛋白体进行分离纯化,具体操作按照 Bio-Scale Mini profanity IMAC 操作手册进行。分离纯化后的目的蛋白置于处理好的透析袋中,依次放入含有 8、6、4、2、1、0 mol/L 尿素的 Tris-HCl 缓冲液中(50 mmol/L,pH 7.4),每一梯度均在 4 °C 搅拌透析各 4 h,复性后冻干称重保存于 -80 °C。

1.6 重组蛋白的活性验证

菌悬液的制备 将抑菌实验所用 5 种菌株于营养肉汤培养基 35 °C 培养 12 h 使其活化,最后用 PBS 缓冲液稀释成 5 × 10⁸ 菌悬液备用。

重组目的蛋白 rFc-Kazal 溶液的制备 将纯化冻干的蛋白用 PBS 缓冲液溶解,稀释为 10 μg/mL 和 5 μg/mL 待用。

向每个平板内倒入 15 mL 营养琼脂固体培养基,待培养基凝固后,取 50 μL 菌液均匀涂布于固体培养基上,每种指示菌设 3 个重复。每个平板中放置 3 个牛津杯(外径 8 mm),其中两个分别加入质量浓度 10 和 5 μg/mL 的重组蛋白溶液 200 μL,另外一个加入 200 μL PBS 缓冲液作阴性对照,置于 35 °C 恒温培养箱中培养 12 h^[15-16]。游标卡尺测量抑菌圈,计算平均值,进行分析比较。

2 结果

2.1 *Fc-Kazal* 基因 ORF 区 cDNA 序列分析

Fc-Kazal 基因 ORF 区全长 390 bp,编码多肽

序列 130aa,其中信号肽区含 14 个 aa,成熟肽区含 116 个 aa。经 ExPasy 的 SMART 分析其预测氨基酸序列后,发现成熟肽中含有两个串联的 Kazal 结构域(FcSPI-D1 和 FcSPI-D2),这是 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员的典型特征。FcSPI-D1(E 值 = $1.37e^{-11}$)始于第 28 位,终止于第 71 位,该结构域中具有完整 Kazal 结构域中的 6 个保守半胱氨酸,形成 3 个二硫键($C^{29}-C^{58}$, $C^{33}-C^{51}$ 和 $C^{40}-C^{71}$); FcSPI-D2(E 值为 $1.22e^{-8}$)始于第 76 位,终止于第 121 位,该结构域的 6 个保守半胱氨酸也形成 3 个二硫键($C^{77}-C^{108}$, $C^{81}-C^{100}$ 和 $C^{89}-C^{121}$)。在该序列中还预测到一些其它的功能性位点,如过氧化物酶激活位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点等。

2.2 多序列比对分析

基于 BlastP 结果将 *Fc-Kazal* 成熟肽氨基酸序列推断的两个 Kazal 结构域与其它甲壳动物中的 Kazal 结构域进行比对,结果发现它们有一个完全一致的序列标签[VCG-x(4)-TY](图 1),将甲壳动物中与 *Fc-Kazal* 有较高同源性的 Kazal-SPI 做系统发生树(图 2),分析它们之间的进化关系,结果显示这些序列共聚为两组,分别来源于血细胞和肝胰腺,两类 Kazal-SPI 基因序列的特征具有较明显差异。

2.3 *Fc-Kazal* 在对虾各组织中的分布

利用半定量 RT-PCR 方法分析了 *Fc-Kazal* mRNA 在不同组织中的表达特征(图 3),从图中可以看到该基因在血细胞、鳃和淋巴器官等富含血细胞的组织中表达水平最高,在心脏、肠和肝胰腺中也有一定的表达,而在眼柄、神经和肌肉中无表达,这说明 *Fc-Kazal* 的表达具有一定组织特异性。

2.4 重组蛋白的表达与纯化

Fc-Kazal 成熟肽的扩增及重组表达载体的构建 根据 *Fc-Kazal* 的 cDNA 序列设计带有酶切位点的引物,以含有 *Fc-Kazal* 的质粒 Fc-Kazal/pMD18-T 为模板进行 PCR 扩增,获得含有其 ORF 成熟肽的目的片段;回收片段,连入表达载体 pCR[®] T7/NT TOPO[®] TA 后转化 BL21(DE3)plysS 感受态细胞,重组载体测序结果表明载体构建成功。

重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析 经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 检测重组目的蛋白(rFc-Kazal)的表达,rFc-Kazal 的表达与诱导时间显著相关,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 之后,伴随着诱导时间的延长,蛋白的表达量显著增加,当诱导到 5 h 后表达量达到平台期,继续培养,目的蛋白的表达量相对稳定,不再显著增加(图 4)。

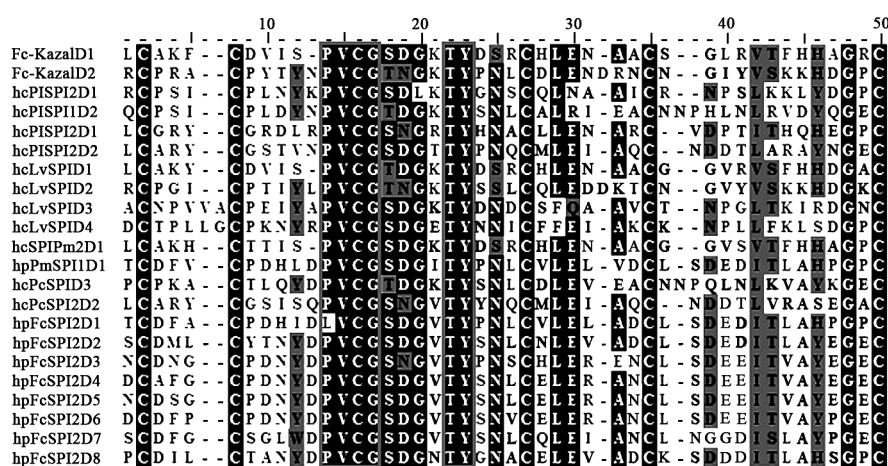


图 1 来源于甲壳动物 Kazal 型抑制因子结构域的多序列比对

典型序列标签[VCG-x(4)-TY]用方框标出。

Fig. 1 Multiple alignments of Kazal-type serine protease inhibitor domains from crustaceans conserved signature sequence[VCG-x(4)-TY]in Kazal domain are marked in the box.

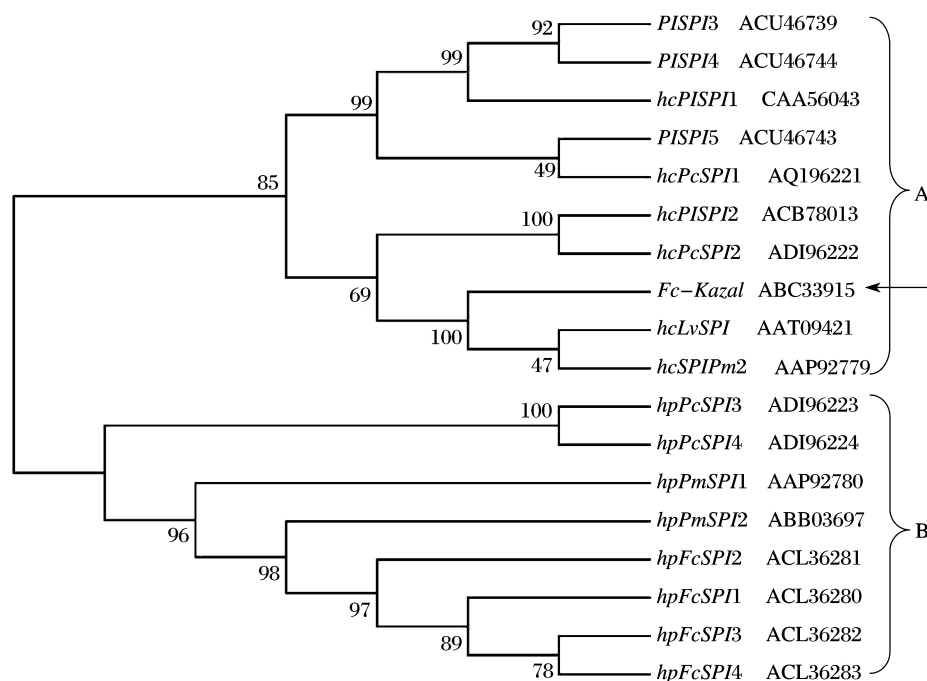


图2 *Fc-Kazal* 与其它来源于甲壳动物的 Kazal 型蛋白酶抑制剂进化树分析

图中包括来源于南美白对虾的 *hcLvSPI*; 来源于克氏原螯虾的 *hcPcSPI1*、*hcPcSPI2*、*hpPcSPI3* 和 *hpPcSPI4*; 来源于斑节对虾的 *hpPmSPI1*、*hpPmSPI2*、*hcSPIPm2*; 来源于淡水螯虾的 *hcPISPI1*、*hcPISPI2*、*PISPI3*、*PISPI4* 和 *PISPI5*; 来源于中国明对虾的 *Fc-Kazal*、*hpFcSPI1*、*hpFcSPI2*、*hpFcSPI3* 和 *hpFcSPI4*。NJ 树的构建基于 MEGA 4.0 软件, GenBank 号标注在图中。组 A 中 Kazal-SPI 来源于血细胞, 组 B 中 Kazal-SPI 来源于肝胰腺, 其中箭头标示为中国明对虾 *Fc-Kazal*。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the *Fc-Kazal* with other crustaceans Kazal-type inhibitors

Kazal-type inhibitors were used from *L. vannamei* (*hcLvSPI*), *P. clarkii* (*hcPcSPI1*, *hcPcSPI2*, *hpPcSPI3* and *hpPcSPI4*), *P. monodon* (*hpPmSPI1*, *hpPmSPI2* and *hcSPIPm2*), *P. leniusculus* (*hcPISPI1*, *hcPISPI2*, *PISPI3*, *PISPI4* and *PISPI5*), *F. chinensis* (*Fc-Kazal*, *hpFcSPI1*, *hpFcSPI2*, *hpFcSPI3* and *hpFcSPI4*). NJ tree produced by MEGA 4.0 software, the GenBank accession number of each inhibitor is shown in the figure. The inhibitors in group A are from haemocytes, and the inhibitors in group B are from hepatopancreas. *Fc-Kazal* was marked with the arrow.

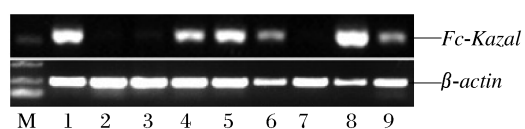


图3 RT-PCR 方法检测中国明对虾不同组织中 *Fc-Kazal* 的表达情况

M. Marker; 1. 鳃; 2. 眼柄; 3. 肌肉; 4. 心脏; 5. 淋巴器官; 6. 肝胰腺; 7. 神经; 8. 血细胞; 9. 肠。

Fig. 3 RT-PCR analysis of *Fc-Kazal* gene expression from different tissues of *F. chinensis*

M. Marker; lane 1. gill; lane 2. eyestalk; lane 3. muscle; lane 4. heart; lane 5. oka organ; lane 6. hepatopancreas; lane 7. nerve; lane 8. haemocytes; lane 9. intestine.

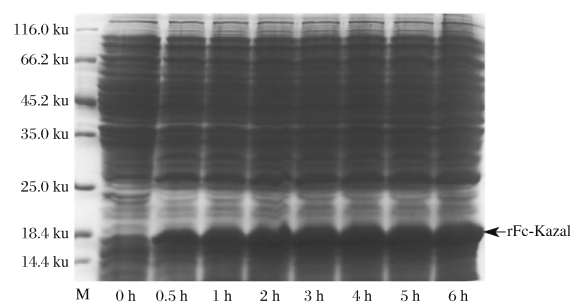


图4 不同诱导时间对 rFc-Kazal 表达量的影响

Fig. 4 Expressed profile of rFc-Kazal during different time after being induced by IPTG

质谱鉴定结果 重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后,切下目的条带,利用 LC-ESI-MS 进行分析和鉴定。用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对后发现,中国明对虾 Kazal-type proteinase inhibitor(GI83638451)推导的氨基酸序列中有 3 条肽段与 rFc-Kazal 蛋白完全匹配,序列

分别为 -CHLENAACSGLR-、-VTFHHAGR- 和 TYPNLCLENDNRNCNGIYVSK(图 5)。由此可以判定,上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白 rFc-Kazal,中国明对虾 *Fc-Kazal* 成熟肽成功地获得了体外重组表达。

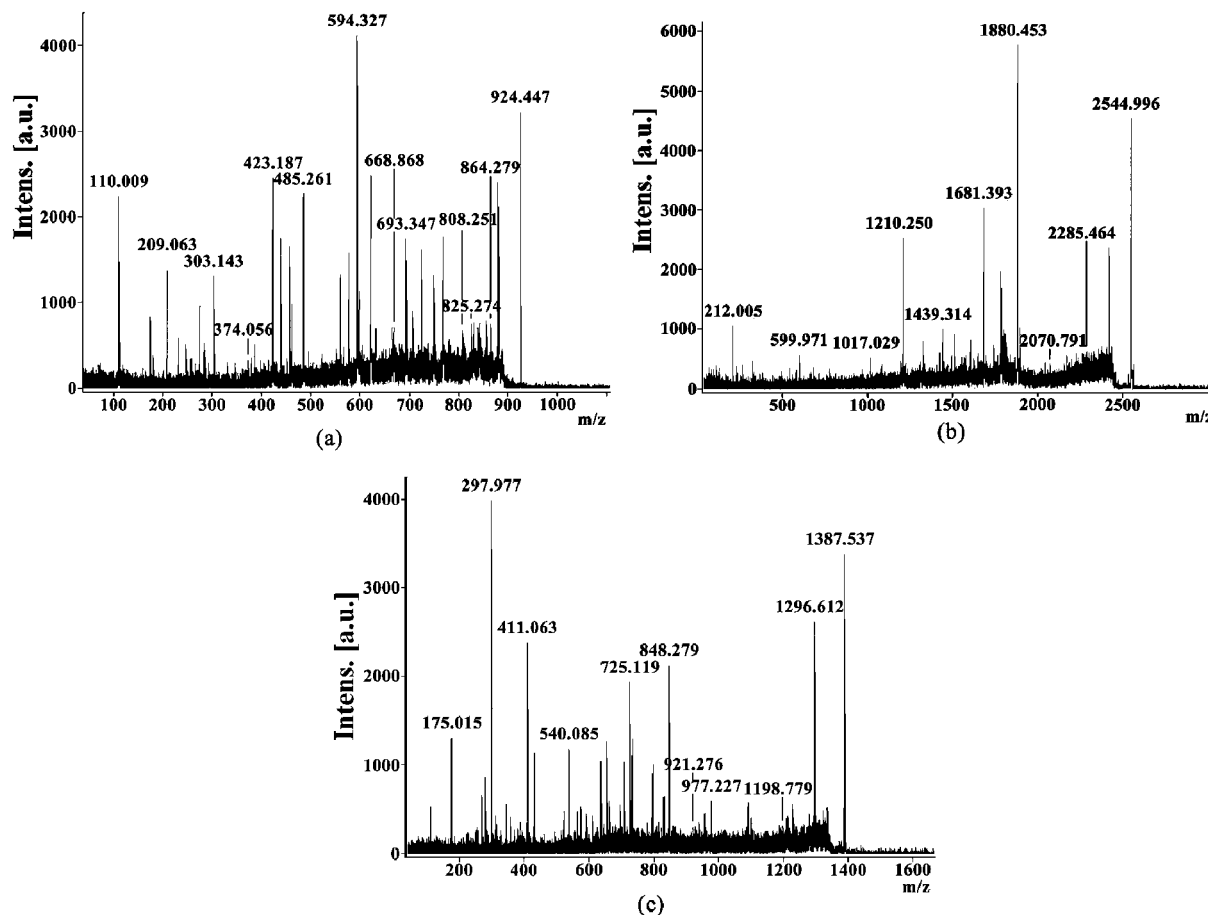


图 5 重组蛋白(rFc-Kazal)中与中国明对虾相匹配的 3 肽段(a、b 和 c)以及它们在中国明对虾 *Fc-Kazal* 成熟肽氨基酸序列中的位置

a、c 匹配肽段用下划线标出,方框中为 b 匹配肽段,横坐标代表质核比,纵坐标代表离子强度。

Fig. 5 Characteristic spectrum of the matched peptide fragments with *F. chinensis*

a, b and c showed the spectrums of matched peptide fragments of -CHLENAACSGLR-, -VTFHHAGR- and -TYPNLCLENDNRNCNGIYVSK-

The abscissa represents the nuclear mass ratio, the ordinate axis represents the ionic strength.

重组蛋白 rFc-Kazal 的纯化与复性 利用 Ni-IDA 技术对目的蛋白进行纯化,电泳检测显示在 18.4 ku 下方有单一条带,这与 rFc-Kazal 预测分子量(16.25 ku)的结果相一致(图 6),纯化的目的蛋白复性后得率约为 0.4 g/L。

2.5 重组蛋白 rFc-Kazal 的活性分析

用牛津杯法验证重组表达的 rFc-Kazal 蛋白对致病菌的抑菌活性,结果显示各受试平板的对照组周围均未出现明显抑菌圈;当 rFc-Kazal 质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、

杀鲑气单胞菌、苏云金芽孢杆菌有微弱的抑菌作用;当抑制剂质量浓度达到 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对上述 4 种菌有明显的抑菌作用,其中对鳗弧菌的抑制作用最强(表 1);但 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组蛋白对哈维氏弧菌没有呈现出可见的抑制效果。

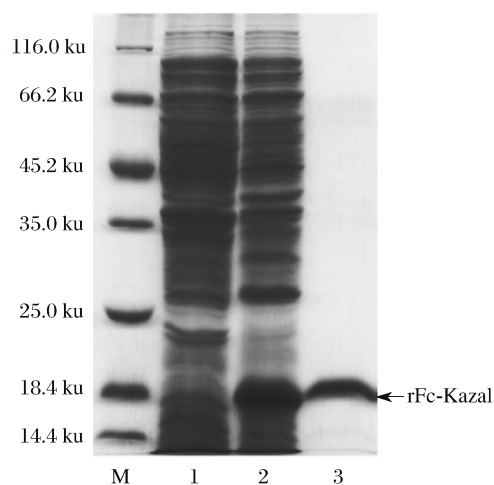


图 6 重组蛋白 rFc-Kazal 的纯化

M. 蛋白质分子量标记; 1. 未加入 IPTG 进行诱导的阴性对照; 2. 加入 IPTG 诱导 5 h 达到的蛋白; 3. 纯化目的蛋白。

Fig. 6 The purification of rFc-Kazal analysis by SDS-PAGE

M. protein molecular weight marker; 1. total proteins of bacteria (non-induced); 2. total proteins of bacteria (induced for 5 h); 3. purified target protein (rFc-Kazal).

表 1 牛津杯法测定 rFc-Kazal ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) 对 4 种致病菌的抑菌圈

Tab. 1 Antibacterial circle of rFc-Kazal on four kinds of pathogenic bacteria by oxford plate assay system

菌株 bacterial strain	直径/mm diameter
鳗弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	15.4 ± 1.2
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	14.2 ± 1.6
杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i>	14.6 ± 1.5
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13.2 ± 0.6

3 讨论

长期以来,对丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究一直主要集中在脊椎动物上,但近些年来,参与无脊椎动物重要生理过程的丝氨酸蛋白酶抑制剂也引起了人们的关注,例如鲨的凝血级联反应^[17]和节肢动物的先天免疫应答^[18]。在甲壳动物中,存在于血淋巴中的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子被认为参与调控宿主的免疫防御反应或对抗入侵病原微生物分泌的蛋白酶。我们从中国明对虾血细

胞中克隆并得到了具有两个 Kazal 结构域的丝氨酸蛋白酶抑制剂,分析了该基因的组织分布特性,并通过原核表达系统对该抑制剂的成熟肽进行了重组表达和活性分析。

Kazal-SPI 家族成员的结构中含有一个到多个数目不等的 Kazal 型结构域,利用不同的结构域,它们可以同时抑制不止一个丝氨酸蛋白酶^[19],包括抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、凝血酶和类胰蛋白酶。典型的 Kazal 结构域由约 50 个氨基酸组成,其中含有 6 个半胱氨酸形成 3 个二硫键来稳定结构域的构型^[5]。FcSPI-D1 和 FcSPI-D2 分别由 44 和 46 个残基组成,都具有形成 3 个二硫键所需的完整的 6 个半胱氨酸,在 FcSPI-D1 和 FcSPI-D2 中都有一个完全一致的序列标签 [VCG-x(4)-TY] (图 1),这段序列非常典型,在各种生物的 Kazal-SPI 中都是高度保守的。在 *Fc-Kazal* 的两个结构域中 Cys 的分布具有相似的特征: C-x3-C-x6, 7-C-x6-Y-x3-C-x6, 7-C-x12-C, 在典型的 Kazal 标签序列中 (InterPro code: IPR002350), 这个同一的分布模式仅包括 Cys2-Cys5 之间的序列,即 C-x7-C-x6-Y-x3-C-x2, 3-C。然而海葵的抑制剂在 Cys4-Cys5 之间有 6 个残基^[20],来自其它对虾、螯虾、珊瑚以及我们克隆得到的中国明对虾的 Kazal 结构域都有一个类似这样分布的标签序列 (C-x7-C-x6-Y-x3-C-x6-C), 表明这样一个结构在水生生物中普遍存在。

Kazal-SPI 家族成员抑制蛋白是通过底物相似机制和 P1 位点的结构域特异性的方式进行的,对 Kazal-SPI 来说, P1 位点氨基酸是最重要的残基,它决定着抑制剂对相关酶的抑制特异性^[21]。通常, Kazal 结构域的 P1 位点为精氨酸和赖氨酸,抑制胰蛋白酶的活性; P1 位点为酪氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、亮氨酸或苯丙氨酸的抑制胰凝乳蛋白酶的活性; P1 氨基酸残基是丙氨酸和丝氨酸的抑制弹性蛋白酶活性; P1 氨基酸残基是天冬氨酸和苏氨酸的抑制蛋白酶 K 和枯草杆菌蛋白酶的活性^[22]。有些 Kazal 结构域可能会缺乏其预测的活力,如斑节对虾血细胞中具有 5 个 Kazal 结构域的 SPIPm2,其第一个结构域的 P1 残基为苏氨酸,推测其可能抑制枯草杆菌蛋白酶的活性,但结果显示该结构域没有任何抑制作用^[23]。推断的 *Fc-Kazal* 两个结构域的 P1 残基分别为缬氨酸和酪氨酸,预测可分别抑制枯草杆菌蛋白酶和

胰凝乳蛋白酶等,这说明该基因可能同时在作用于病原感染和调节内生性蛋白酶方面具有重要功能,然而它确切的功能和生物学活力需要进一步的体外实验来验证。

对 *Fc-Kazal* 组织分布进行研究发现,该基因在血细胞、鳃和淋巴器官中有高水平的表达,鳃和淋巴器官中含有大量的血细胞或吞噬细胞,它们在对虾(*Procambarus clarkii*)的免疫防御过程中具有重要的功能,丝氨酸蛋白酶抑制剂基因选择性的水平表达可能与其功能的发挥有一定联系。抑制剂基因也在心脏、肠和肝胰腺组织中有一定水平的表达,这可能是由于渗透进这些组织中的血细胞所导致的结果。克氏原螯虾的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 hcPcSPI2 在血细胞中大量表达,同时在心脏、鳃、肠中也有表达^[24],这与本实验的结果相似。

甲壳类动物病原菌主要为弧菌属、假单胞菌属和气单胞菌属的一些细菌,如由弧菌、假单胞菌、气单胞菌等引起的对虾的烂鳃病、红腿病和甲壳溃疡病(褐斑病)等。其中弧菌属的细菌是对虾养殖过程中最为常见、危害最大的病原性细菌。来源于水螅的具有 3 个 Kazal 结构域的抑制剂 Kazal2 具有很强的杀灭金黄色葡萄球菌的能力^[25];在克氏原螯虾血细胞中克隆到的 hcPcSPI1 和 hcPcSPI2 抑制枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的生长^[24,26],本研究经重组表达获得的对虾 rFc-Kazal 对鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌、苏云金芽孢杆菌有一定的抑菌作用,其中对致病菌鳃弧菌的抑制作用最强,说明 Kazal 型蛋白酶抑制剂在对虾抗细菌侵染的免疫反应中发挥着重要的作用,对 *Fc-Kazal* 调控机体先天免疫应答通路的深入研究正在进行中,这些工作有望为深入了解对虾免疫应答机制和开展对虾病害防治研究提供重要的理论参考。

本研究工作得到了中国科学院海洋研究所相建海研究员和李富花研究员的大力支持和帮助,在此表示诚挚的感谢。

参考文献:

[1] KANOST M R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23 (4 - 5): 291 - 301.

[2] ZHU L, SONG L, CHANG Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(3): 320 - 331.

[3] POLANOWSKI A, WILUSZ T. Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 1996, 43(3): 445 - 453.

[4] KAZAL L A, SPICER D S, BRAHINSKY R A. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor anticoagulant protein from pancreas [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1948, 70(9): 3034 - 3040.

[5] LASKOWSKI M, KATO I. Protein inhibitors of proteinases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1980, 49: 593 - 626.

[6] KATO I, SCHRODE J, KOHR W J, *et al.* Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains [J]. *Biochemistry*, 1987, 26(1): 193 - 201.

[7] PSZENNY V, ANGEL S O, DUSCHAK V G, *et al.* Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000, 107(2): 241 - 249.

[8] ZHENG Q L, CHEN J, NIE Z M, *et al.* Expression, purification and characterization of a three-domain Kazal-type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146(2): 234 - 240.

[9] ODUM L, BUNDGAARD J R, JOHNSEN A H. A Kazal-type trypsin inhibitor from the protochordate *Ciona intestinalis* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 259(3): 872 - 876.

[10] WANG B, ZHAO J, SONG L, *et al.* Molecular cloning and expression of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, and the inhibitory activity of its recombinant domain [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 629 - 637.

[11] JOHANSSON M W, KEYSER P, SÖDERHÄLL K. Purification and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 223(2): 389 - 394.

[12] SOMPRASONG N, RIMPHANITEHAYAKIT V,

- TASSANAKAJON A. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(11) :998 – 1008.
- [13] WANG Z H, ZHAO X F, WANG J X. Characterization, kinetics, and possible function of Kazal-type proteinase inhibitors of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(6) :885 – 897.
- [14] 刘逸尘. 中国明对虾体内凝结反应过程中相关免疫基因的克隆与表达研究 [D]. 青岛:中国科学院海洋研究所, 2005.
- [15] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3) : 110 – 111.
- [16] 刘健, 王海雁, 赵淑江. 牛津杯法测定五倍子对大黄鱼病原弧菌的体外抑菌活力 [J]. *海洋科学*, 2009, 33(11) :44 – 47.
- [17] IWANAGA S. The Limulus clotting reaction [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1993, 5 :74 – 82.
- [18] KIM M S, BAEK M J, LEE M H, *et al.* A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (42) : 39999 – 40004.
- [19] KATO I, SCHRODE J, KOHR WJ, *et al.* Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains [J]. *Biochemistry*, 1987, 26(1) :193 – 201.
- [20] TSCHESCHE H, KOLKENBROCK H, BODE W. The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia Sulcata*-a ‘ nonclassical ’ Kazal-type protein [J]. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1987, 368(10) :1297 – 1304.
- [21] OZAWA K, LASKOWSKI JR M. The reactive site of trypsin inhibitors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241(17) :3955 – 3961.
- [22] NIRMALA X, KODRIK D, ŽUROVEC M, *et al.* Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(7) :2064 – 2073.
- [23] DONPUDSA S, TASSANAKAJON A, RIMPHANITCHAYAKIT V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(4) :481 – 488.
- [24] LI X C, ZHANG R R, SUN R R, *et al.* Three Kazal-type serine proteinase inhibitors from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and the characterization, function analysis of hcPcSPI2 [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28 (5 – 6) : 942 – 951.
- [25] AUGUSTIN R, SIEBERT S, BOSCH T C. Identification of a Kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra’s innate immune system [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33 (7) : 830 – 837.
- [26] LI X C, WANG X W, WANG Z H, *et al.* A three-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor exhibiting domain inhibitory and bacteriostatic activities from freshwater crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33 :1229 – 1238.

Recombinant expression and bioactivity assay of Kazal-type serine proteinase inhibitor (*Fc-Kazal*) from *Fenneropenaeus chinensis*

HUANG Ming^{1,2#}, LIU Yi-chen^{1,2#}, ZHANG Yi-chen^{1,2}, SUN Yan², SUN Jin-sheng^{1,2,3*}

(1. College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Cyto-Genetical and Molecular Regulation, Tianjin 300387, China;

3. Tianjin Aquaculture Disease Prevention & Treatment Center, Tianjin 300221, China)

Abstract: Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is one of the most important aquaculture animals in China. The studies on the innate immune responses of shrimp, especially on immune defense against the main crustacean pathogens, will provide more knowledge of shrimp immunity to prevent infectious diseases. Arthropod innate defence responses [e. g. prophenoloxidase (proPO) activation and Toll pathway initiation] and many other biological processes are mediated by serine proteinase (SP) cascades. If the activity of SPs is out of control, it will be fatal to organisms. Serine protease inhibitors (SPI) play a critical role in precise regulation of SP activity, and also directly participate in the selection and digestion of pathogen. One of the well known SPI is the Kazal-type SPI which are usually multi-domain proteins containing more than one Kazal domain. Each domain contains 50 – 60 amino acids with six cysteine residues forming a 1 – 5, 2 – 4, 3 – 6 disulphide bridges resulting in a characteristic three-dimensional structure. The inhibitory specificity of a Kazal domain varies with a different reactive P1 amino acid, which is the second amino acid after the second Cys. However, the knowledge about the Kazal-type SPI in aquatic animals' innate immunity is limited. In this paper, the fragment encoding the Kazal-type SPI (*Fc-Kazal*) mature peptide was amplified. It was predicted that the mature peptide was composed of 114 amino acids with a calculated molecular mass of 16.25 ku and a theoretical isoelectric point of 8.9. *Fc-Kazal* contains two tandem Kazal domains. Each of the domain contains six conserved cysteine residues forming three disulfide bridges (C1 – C5, C2 – C4, C3 – C6), which are identical to those of the classical Kazal-type proteinase inhibitor family members. Semi-quantitative RT-PCR revealed that transcripts of *Fc-Kazal* were highly expressed in the gills, haemocytes and lymphoid organ. Low expressions could be found in the heart, intestine and hepatopancreas. No expressions were observed in eyestalks, ventral nerve cord and muscle. The recombinant protein was expressed by pCR[®] T7/NT TOPO[®] TA system. The result showed that the fusion protein (rFc-Kazal) was expressed in the form of inclusion bodies. The LC-ESI-MS analysis showed that three peptide fragments of rFc-Kazal were identical to the corresponding sequence of *Fenneropenaeus chinensis* Kazal-type proteinase inhibitor (GI83638451). Fusion protein was purified by immobilized-metal affinity chromatography and Ni-NTA technology. The concentration of purified rFc-Kazal was 0.4g/L. The effect of refolded rFc-Kazal on bacteriostatic activity was assayed in this research. The results indicated that the rFc-Kazal has antimicrobial activity against *Vibrio anguillarum*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas salmonicida* and *Bacillus thurigiensis*. The results reveal that *Fc-Kazal* may play an important role in the innate immunity of the shrimp.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; Kazal serine proteinase inhibitor; innate immunity; recombinant expression; bacteriostatic activity

Corresponding author: SUN Jin-sheng. E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

#HUANG Ming and LIU Yi-chen contributed equally to this work.