

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00892

黄喉拟水龟转铁蛋白重组表达及抗菌活性分析

高明英^{1,2} 朱新平^{1,2} 史燕¹ 赵建¹ 赵密^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产种质资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 转铁蛋白具有多种生物学功能, 不仅参与铁的转运, 而且具有抗菌、免疫调节等功能。对黄喉拟水龟转铁蛋白(*Mauremys mutica* transferrin, *MaTf*)原核表达、重组蛋白纯化、抗菌活性检测及 *MaTf*在蛋白水平的表达特征进行了分析研究。通过用 RT-PCR 技术扩增 *MaTf*的编码序列, 克隆至载体 pET-32 a (+); 转化 BL21 (DE3), 构建了其原核表达载体; 优化表达条件(30℃, 4h, 0.8 mmol/L IPTG), 使 *MaTf*融合蛋白在 BL21 中高效表达; 采用 His Bind 柱亲和层析与浓缩的方法纯化目的蛋白, Western blot 证实获得纯度较高的 *MaTf* 重组蛋白; 抑菌试验表明, *MaTf* 重组蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和黏质沙雷氏菌均有明显的抑菌作用; 用 *MaTf* 重组蛋白制备多克隆抗血清, Western blot 免疫印记法分析转铁蛋白在体内的表达特征, 结果显示其在肝脏、脾脏、肾脏、心脏 4 个组织中的表达量为: 肝脏>脾脏>肾脏>心脏, 与 *MaTf* 在 RNA 水平上的表达特征具有相似性。研究为探索转铁蛋白在黄喉拟水龟非特异性免疫反应中的作用提供了重要信息。

关键词: 黄喉拟水龟; 转铁蛋白; 重组表达; 抗菌性

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)05-0892-06

转铁蛋白(Transferrin, Tf)具有多种生物学功能, 它不仅参与铁的转运, 而且具有抗菌、免疫调节等功能^[1-5]。细菌的正常生长需要铁离子来维持, 转铁蛋白在结合介质中铁离子的过程中起到抑制需铁细菌生长的作用, 从而导致病原菌死亡^[6]。本实验室用黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)感染黄喉拟水龟, 在构建肝脏全长 cDNA 文库时, 发现转铁蛋白基因在文库中的表达丰度最高^[7], 人工感染黏质沙雷氏菌后黄喉拟水龟转铁蛋白基因在肝脏、脾脏、肾脏及心脏中的表达量均被上调, 表明转铁蛋白可能参与了黄喉拟水龟的免疫应答反应^[8]。本研究对 *MaTf* 进行了原核表达, 同时对表达产物进行纯化与复性, 继而进行了抗菌性分析。通过制备黄喉拟水龟转铁蛋白的多克隆抗体对 *MaTf* 在体内蛋白水平的表达特征进行了分析, 为进一步证明其在机体内的抗菌性和免疫调节功能提供了证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用龟 本实验所用黄喉拟水龟为 13 只健康个体, 体重为(140±20) g, 取自珠江水产研究所龟类繁育基地, 实验前于实验室暂养一周。

引物设计与合成 根据 *MaTf* 的 ORF 框序列设计一对引物, 在上下游引物的 5' 端分别引入了 *Eco*R 和 *Xho* 两个酶切位点, 用以扩增 *MaTf* 成熟肽。所合成的引物序列如下:

IBP-Former: 5'-CggAATTGgACCCTCCAgCCC
AAAGTT-3'

IBP-Reverse: 5'-CCgCTGgAgGTCCAAgTCAC
TgAAgCTg-3'

设计的引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 合成的引物用去离子双蒸水(ddH₂O)溶解至 10 μmol/L, -20℃ 保存备用。

收稿日期: 2012-02-09; 修订日期: 2012-06-20

基金项目: 国家农业科技成果转化资金(2011GB23260021); 广州市珠江科技新星专项(2012089); 中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项(2012A0403)资助

作者简介: 高明英(1984—), 女, 山东济南人; 硕士研究生; 研究方向为种质资源与遗传育种。E-mail: gaomingying666@163.com

通讯作者: 朱新平(1964—), 男, 研究员, 博士生导师; E-mail: zhuxinpinglei1964@yahoo.com.cn

主要试剂 低分子量预染蛋白质 Marker、蛋白提取试剂盒、增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒、HRP-GoatAnti-Rabbit IgG(H+L)及硝酸纤维素膜购自广州合达(天根)生物公司; His-Tag(2A8) Mouse mAb 及 HRP-GoatAnti-Mouse IgG(H+L)购自武汉博士德生物工程有限公司。表达载体 pET-32a 由本实验室保存。黏质沙雷氏菌和金黄色葡萄球菌分别由珠江水产研究所谭爱萍助理研究员和潘厚军研究员馈赠。MaTf 的多克隆抗血清由珠海英平生物有限公司制备。

1.2 实验方法

黄喉拟水龟肝脏组织总 RNA 的提取 按照广州合达(天根)生物公司动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书, 提取组织总 RNA, 经 DNase 处理后, 于 -80℃ 储存备用。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 的完整性。

MaTf 的 RT-PCR 扩增及测序 将完整性较好的总 RNA, 按反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 并以此为模板、以原核表达特异性引物进行 PCR 扩增, 获得 MaTf 成熟肽基因双链 DNA。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收 PCR 产物, 纯化 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体, 将构建的 pMD18-T-MaTf 转化 DH5 α , 经过菌落筛选、双酶切、PCR 鉴定, 将筛选到的阳性克隆菌株送英淮捷基(上海)贸易有限公司测序。

重组表达载体的构建 将测序正确的重组克隆质粒 pMD18-T-MaTf 和表达质粒 PET-32a 分别进行 EcoR 、 Xho 双酶切, 凝胶回收, 切取的 MaTf 目的片段经 T4 DNA 连接酶插入载体 pET-32a 中, 构建重组表达质粒 pET-32a-MaTf; 将重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 经酶切鉴定、PCR 鉴定筛选出阳性克隆。

MaTf 阳性克隆菌株的诱导表达及融合蛋白的可溶性分析 选取经鉴定 ORF 框读码正确的阳性克隆菌, 接种于含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中扩大培养。次日以 1~50 分别接种于 5 个 5 mL 含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基的大试管中, 30℃ 230 r/min 振荡培养至 A_{600} 值为 0.6—0.8, 加入 IPTG 至终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 mmol/L, 继续培养 4h, 每隔 1h 取 1 mL 诱导表达菌。

分别收集诱导表达的重组菌、未诱导表达菌及

空载体转化菌, 离心收集菌体, PBS 重悬, 超声波破碎, 12000 r/min 离心 10 min, 分别取上清和沉淀加入等量的 2×SDS 变性缓冲液, 于沸水浴 5min, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分析融合蛋白的可溶性。

表达产物的纯化及多克隆抗体的制备 按照 His Bind Purification Kit 说明书进行蛋白纯化, 纯化后蛋白于 4℃ 在含梯度摩尔浓度尿素的透析液中梯度透析。从透析袋中收集蛋白, 用 PEG 进行浓缩。取 1—2 mL 浓缩后的重组蛋白送珠海英平生物有限公司进行多克隆抗血清的制备。

Western-blot 印记分析 将电泳显示目的蛋白表达量较高的菌株再进行 10%SDS-PAGE 电泳, 用湿转法在硝酸纤维素膜上于 100 毫安转移 3h; 在封闭液 4℃ 过夜或者常温封闭 1h; 1×PBS 洗膜, 加入 His-Tag(2A8) Mouse mAb (1:1000), 37℃ 结合 1—2 h; 洗膜, 加入 HRP-GoatAnti-Mouse IgG(H+L) (1:1000), 37℃ 结合 1—2 h; 洗膜, 用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒鉴定表达产物。

MaTf 重组蛋白抗菌活性检测 采用琼脂糖扩散抑菌圈法^[9], 将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及黏质沙雷氏菌接种到 5 mL LB 液体培养基中于 37℃ 在摇床上培养至对数生长期。取 10 μL 细菌培养液加入到 1 mL 的培养基中混匀, 涂于 LB 固体培养基平板上, 待菌液稍干后, 放置牛津杯, 加入 200 μL 经复性超滤浓缩的 1 g/L MaTf 重组蛋白, 采用最后一次透析液作为对照, 拍照观察并测定清晰的抑菌圈直径。

取灭菌的干净试管 15 支, 分成三组, 每组 5 支, 编号 1—5, 然后将金黄色葡萄球菌、黏质沙雷氏菌和大肠杆菌培养至对数生长期, 再将其稀释至 10^5 /mL, 每支试管中加入 0.5 mL。再向第一支试管中加入 0.5 mL 超滤浓缩的重组蛋白, 混匀后取 0.5 mL 加入到第二支试管中, 同样的方法一直稀释到第五支试管中, 1—5 管中重组蛋白的浓度分别 2.0、1.0、0.5、0.25 及 0.125 g/L, 37℃ 于恒温箱中培养 18h, 观察细菌生长状况, 确定最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)值^[10]。

MaTf 体内表达分析 用广州合达生物有限公司的总蛋白提取试剂盒提取黄喉拟水龟肝脏、肾脏、心脏和脾脏的总蛋白, 各取 100 μL 总蛋白加入等量 2×SDS 变性缓冲液, 于沸水浴 5min, 10% SDS-

PAGE 凝胶电泳, 用湿转法在硝酸纤维素膜上于 100 毫安转移 3h; 在封闭液 4℃过夜或者常温封闭 1h; 1×PBS 洗膜, 加入多克隆抗血清(1:1000), 37℃结合 1—2h; 洗膜, 加入二抗 HRP-GoatAnti-Rabbit IgG(H+L)(1:1000), 37℃结合 1—2h; 洗膜, 用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒鉴定表达产物, 检测转铁蛋白在四个组织中的表达量。

2 结果

2.1 *MaTf* 原核表达载体的构建

以含 *MaTf* 成熟肽基因序列的质粒为模板进行 PCR 扩增, 得到与预期大小相符的片段, 将其进行切胶回收并纯化。回收产物和 pET-32a 载体分别经 *EcoR* /*Xba*I 双酶切、纯化后进行连接, 使目的基因定向克隆至 pET-32a 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选重组菌。所获得的重组菌经 *Xba*I 或 *EcoR* I 单酶切后得到大小约 5.21 kb 的基因片段, 经 *Xba*I 和 *EcoR* 双酶切后得到一条约 5 kb 的载体片段和一条 2121 bp 的目的基因片段, 与 PCR 扩增得到的基因片段大小相符合。重组菌经序列测定, 结果表明所克隆的 *MaTf* ORF 框读码正确, 说明 *MaTf* 已经成功插入到 pET-32a 载体上。

2.2 重组菌 *MaTf* 融合蛋白的表达

将 pET-32a/Tf 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)得到 BL21/pET-32a/Tf 重组菌, 经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量约 97 kD 处有一条表达量较高的蛋白带, 与理论推算的蛋白分子量相符, 而空质粒 pET-32a 及含未经 IPTG 诱导的 BL21/pET-32a/Tf 在相同位置处没有目的带出现, 说明 *MaTf* 融合蛋白成功表达。

经浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导, 在不同时间里 BL21/pET32a-Tf 重组菌表达量不同。用 10% SDS-PAGE 胶检测, 发现不同浓度的 IPTG 诱导 1h 时, 表达量没有很大的差异; 诱导 2h 时 0.6、0.8 mmol/L 这两个浓度诱导的重组菌的表达量最多; 诱导 3h 时 0.4、0.8 mmol/L 这两个浓度诱导的重组菌的表达量最多; 诱导 4h 时 0.4、0.6、0.8 mmol/L 这三个浓度诱导的重组菌的表达量相差不大。综合考虑最后选取 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 诱导 4h 的重组菌进行后续的实验(图 1A)。

空载体及经浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导 4h 的 BL21/pET-Tf 重组菌经超声波破碎细胞后 SDS-

PAGE 分别检测沉淀和上清液, 结果显示 *MaTf* 主要以包涵体形式存在(图 1B)。

2.3 *MaTf* 重组蛋白的纯化复性

重组菌经诱导表达、超声波破碎后, 收集沉淀。用含 2 mol/L urea 的 1×binding buffer 洗涤包涵体两次去除细菌碎片, 再用含 6 mol/L urea 的 1×binding buffer 37℃溶解 1h。离心后取上清, 上清经 His Bind 柱亲和层析纯化后, 梯度透析复性。SDS-PAGE 检测结果检测显示清晰的单一目的条带(图 1C), 表明获得较纯的 *MaTf* 重组蛋白。

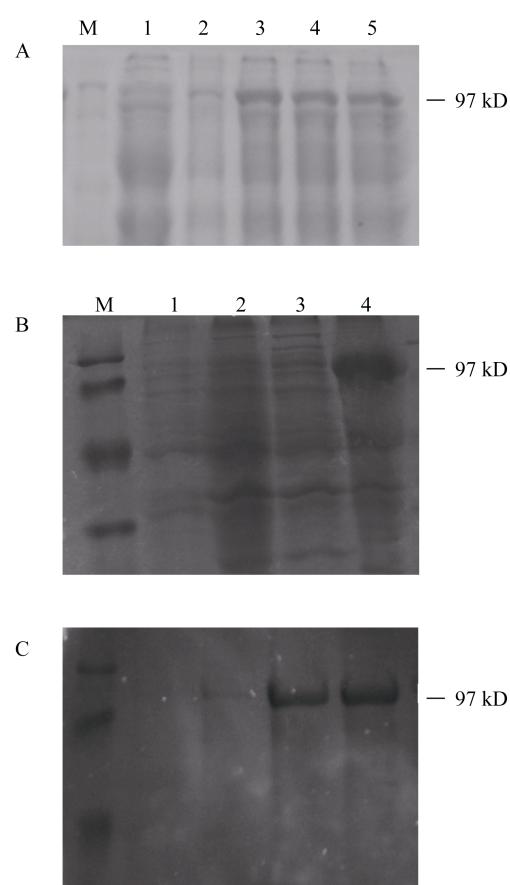


图 1 重组菌融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expressed recombinant *MaTf*. A. IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 诱导 1—4h 重组菌表达量; B. 重组蛋白可溶性分析; C. 经纯化的重组蛋白; M. 低分子量 Marker; A1—5. 空载体对照菌及重组菌诱导 1—4h 重组蛋白的表达量; B1—4. 空载体对照菌及重组菌经超声波破碎后的上清与沉淀; C1—2. 纯化 *MaTf* 重组蛋白
A. The expression of BL21/pET32a-Tf induced from 1h to 4h when concentration of IPTG is 0.8 mmol/L; B. Solubility of *MaTf*; C. Purified *MaTf*; M. Standard protein marker; A1—5. Expression of negative control and BL21/pET32a-Tf induced from 1h to 4h when concentration of IPTG is 0.8 mmol/L; B1—4. The Supernatant and Precipitation of negative control and BL21/pET-Tf after smash by supersonic wave; C1—2. Recombinant *MaTf* after purification

2.4 MaTf 重组蛋白的 Western blot 鉴定

以 pET-32a 为表达载体所表达的融合蛋白带 His 标签, 以针对 His 标签的单克隆抗体为一抗和以 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blot 分析, 在 97 kD 位置出现了特异的反应带, 说明目的蛋白得到了表达 (图 2)。

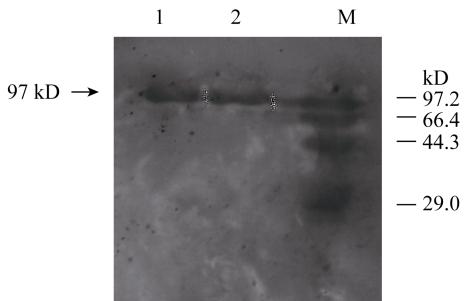


图 2 Western blot 检测纯化的 MaTf 重组蛋白

Fig. 2 Western blot analysis of the recombinant MaTf
M. 低分子蛋白 Marker; 1, 2. 纯化的 MaTf 重组蛋白

M. Standard protein marker; 1, 2. Recombinant MaTf after purification

2.5 MaTf 重组蛋白的抑菌活性检测

抑菌试验表明, 重组蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和黏质沙雷氏菌均有有明显的抑菌作用 (图 3)。金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及黏质沙雷氏菌的抑菌圈直径分别为 8、5 及 4 mm。对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度即 *MIC* 值为 1.0 g/L, 对大肠杆菌和黏质沙雷氏菌的 *MIC* 值大于 2.0 g/L。抑菌效果是金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>黏质沙雷氏菌。



图 3 MaTf 重组蛋白抑菌活性检测

Fig. 3 The antimicrobial activities of recombinant MaTf on *S. aureas*, *E. coli* and *Serratia marcescens*

1. 金黄色色葡萄球菌; 2. 大肠杆菌; 3. 黏质沙雷氏菌
1. *S. aureas*; 2. *E. coli*; 3. *Serratia marcescens*

2.6 MaTf 体内表达分析

提取黄喉拟水龟肝脏、肾脏、心脏和脾脏的总蛋白, 用珠海英平生物有限公司制备多克隆抗血清为一抗, 利用 Western Blotting 检测 *MaTf* 在 4 个组织中的表达量, 结果显示转铁蛋白在肝脏、肾脏、心脏及脾脏四个组织中的表达量为: 肝脏>脾脏>肾脏>心脏(图 4)。

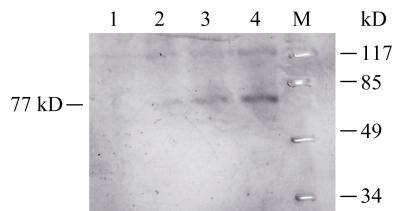


图 4 Western blot 检测黄喉拟水龟体内转铁蛋白的表达

Fig. 4 Western blot analysis of the *Matf* *in vivo*

M. 低分子蛋白 Marker; 1. 心脏; 2. 肾脏; 3. 脾脏; 4. 肝脏
M. Standard protein marker; 1. Heart; 2. Kidney; 3. Spleen; 4. Liver

3 讨论

3.1 MaTf 原核表达及重组蛋白纯化

pET-32a 载体的表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导, 当诱导充分时几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白。而大肠杆菌 BL21 的 T7RNA 聚合酶基因受 L 启动子的控制, 可以通过 IPTG 来诱导, 使目的蛋白表达量达到菌体总蛋白的 50%以上。本实验用 IPTG 来诱导, 通过条件的优化, 以 0.8 mL/L IPTG 诱导 4h 时重组蛋白表达效果最好。

pET-32a 载体上含有 His 标签, 可以用亲和层析方法纯化融合蛋白。由于该载体上带有一段编码硫氧还蛋白的序列和 6 个组氨酸标签序列, 并与插入的目的基因一起融合表达, 因此表达产物的相对分子质量(97 kD)比目的蛋白相对分子质量(77 kD)大 20 kD。

本实验得到的目的蛋白大部分以包涵体形式表达, 可能是由于蛋白较大, 有 706 个氨基酸残基, 容易形成包涵体。表达产物形成包涵体虽然没有活性, 但可简化产物的纯化过程, 降低成本。本研究采用超声波裂解菌体, 离心除去大部分可溶性菌体蛋白, 沉淀中的包涵体除含有重组蛋白外, 还含有细菌杂蛋白、核酸等成分, 洗涤液加入尿素反复悬洗、离心, 可将细胞碎片和包涵体中的杂质一起除去, 获得纯度较高的包涵体。

3.2 MaTf 重组蛋白抗菌性分析

体外抑菌试验发现 MaTf 重组蛋白对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性的黏质沙雷氏菌及大肠杆菌均有抑菌作用, 其中尤以对金黄色葡萄球菌抑菌作用明显, 反映出黄喉拟水龟转铁蛋白与其他铁蛋白一样, 在抗菌活性作用上均表现为对革兰氏阳性菌抑制作用比革兰氏阴性菌要明显些。这可能与不同细菌细胞膜构成差异有关, 转铁蛋白结

合到细胞膜上, 引起其变化方式或者变化程度存在差异, 从而产生抑菌活性的差异。在鱼类中, 转铁蛋白不同基因型对寄生虫的抗性是有差异的^[5]。黄喉拟水龟转铁蛋白的多样性将有待于进一步研究。

3.3 MaTf 在体内的表达特征

通过制备 MaTf 蛋白的多克隆抗血清, 从蛋白水平上检测转铁蛋白在黄喉拟水龟体内的表达, 通过 Western-blot 免疫印记检测, 结果显示转铁蛋白在肝脏、肾脏、心脏及脾脏 4 个组织中的表达量为: 肝脏>脾脏>肾脏>心脏, 这与其在 RNA 水平上的表达特征具有相似性^[8]。转铁蛋白基因在黄喉拟水龟四种组织中的表达模式与其他脊椎动物非常类似^[11-13]。

铁在脊椎动物各种代谢过程中起着关键性的作用, 铁离子的多与少直接影响机体的功能, 所以铁离子的调节非常重要。铁离子也是其他生物生长所必须的离子, 转铁蛋白通过与各种病原体竞争铁离子而起到杀菌的作用。转铁蛋白在肝脏中呈组成型表达, 这可能与转铁蛋白主要在肝脏中合成有关。脾脏是重要的造血器官, 在机体发育中具有储血、调节血量和产生淋巴细胞的功能^[14], 故转铁蛋白在脾脏中也大量表达。

转铁蛋白是小分子带负荷的循环蛋白, 部分可以从肾小球基底膜漏出, 在近端肾小球被重吸收分解。黄喉拟水龟经沙雷氏菌刺激后, 转铁蛋白在肾中的表达量持续增加^[8], 这可能与肾小球的重吸收作用有关。即转铁蛋白经刺激在其他免疫器官表达量增加, 循环至肾脏时在近端肾小球被重吸收, 故实验中检测到经沙雷氏菌刺激后的肾脏中转铁蛋白的表达量是持续增加的^[8]。肾功能损害时, 肾小管功能失调, 导致尿转铁蛋白升高, 因此转铁蛋白可作为肾功能损害的早期标记物^[15]。心脏是脊椎动物循环系统的动力, 主要由心肌构成, 非免疫器官, 转铁蛋白在心脏中的表达量很少。

致谢:

珠江水产研究所潘厚军研究员提供了金黄色葡萄球菌, 谭爱萍助理研究员提供了黏质沙雷氏菌, 作者在此致以深深的谢意。

参考文献:

- [1] Blaard-Deconinck J M, Masson P L, Osinski P A, et al. Amino acid sequence of cystic peptides of lactoferrin and demonstration of similarities between lactoferrin and trans-

- ferring [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1974, **365**(2): 311—317
- [2] Farnaud S, Evans R W. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties [J]. *Molecular Immunology*, 2003, **40**(7): 395—405
- [3] Elizabeth J D. Antibiotic properties of bovine Lf on helicobacter pylori [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1998, **43**(12): 2573—2812
- [4] Britigan B E, Lewis T S, Waldshmidt M, et al. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, **167**(5): 2921—2928
- [5] Jurecka G F, Wiegertjes K L, Rakus A, et al. Genetic resistance of carp (*Cyprinus carpio L.*) to *Trypanoplasma borreli*: Influence of transferrin polymorphisms [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, **127**(1): 19—25
- [6] Reyes R E, Manjarrez H A, Drago M E. El hierro and la virulencia bacteriana [J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 2005, **25**: 104—107
- [7] Zhao M, Zhu X P, Shi Y, et al. Construction of a smart cDNA library of Asian yellow pond turtle stimulated with *Serratia marcescens* and identification of related genes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(1): 99—104 [赵密, 朱新平, 史燕, 等. 黏质沙雷氏菌诱导的黄喉拟水龟 SMART cDNA 文库构建及相关基因的鉴定. 水生生物学报, 2011, **35**(1): 99—104]
- [8] Gao M Y, Zhu X P, Zhao M, et al. Cloning and expression pattern analysis of transferrin gene in yellow pond turtle [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(4): 557—564 [高明英, 朱新平, 赵密, 等. 黄喉拟水龟转铁蛋白基因的克隆以及表达特征分析. 水生生物学报, 2011, **35**(4): 557—564]
- [9] Bu X J, Du X J, Zhou W J, et al. Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, **24**(5): 723—732 [卜兴江, 杜欣军, 周文杰, 等. 中国明对虾溶菌酶基因克隆、重组表达与性质分析. 生物工程学报, 2008, **24**(5): 723—732]
- [10] Xu S Y, Chen X. Methodology of Pharmacological Experiment [M]. Beijing: People's Medical Publishing House. 2001, 797—889 [徐叔云, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社. 2001, 797—889]
- [11] Cai Z H, Song L S, Gao C P, et al. Molecular cloning and expression characterization of transferrin (TF) gene in red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2005, **15**(5): 105—110 [蔡忠华, 宋林生, 高春萍, 等. 真鲷转铁蛋白基因的克隆与表达特征分析. 高技术通讯, 2005, **15**(5): 105—110]
- [12] Yang L, Gui J F. Positive selection on multiple antique allelic lineages of transferrin in the polyploidy *Carassius auratus* [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, **21**(7): 1264—1277
- [13] Yang L, Zhou L, Gui J F. Molecular basis of transferrin

- polymorphism in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Genetica*, 2004, **121**(3): 303—313
- [14] Lum J B, Infante A J, Makker D M, et al. Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1986, **77**(3): 841—849
- [15] Yin A Q, Dong L, Gao Y T. The Clinical significance of urine transferrin in the type 2 diabetic nephropathy and primary chronic glomerular disease [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Science)*, 2005, **26**(1): 61—63 [尹爱琴, 董玲, 高妍婷. 转铁蛋白在糖尿病肾病和原发性慢性肾小球疾病中的临床意义. 西安交通大学学报(医学版), 2005, **26**(1): 61—63]

RECOMBINANT EXPRESSION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY ANALYSIS OF TRANSFERRIN IN ASIAN YELLOW POND TURTLE

GAO Ming-Ying^{1,2}, ZHU Xin-Ping^{1,2}, SHI Yan¹, ZHAO Jian¹ and ZHAO Mi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Transferrin has a variety of biological functions such as iron transportation, anti-microbial, immunoregulation, etc. In this paper, the expression pattern and the antibacterial activity of purified recombinant protein of *Mauremys mutica* transferrin (MaTf) were analyzed. The ORF of MaTf were obtained by RT-PCR, then ligated into pET-32 a (+) vector to construct recombinant vector for prokaryotic expression, then transformed into *E. coli* BL21 competent cells. The putative protein was successfully expressed with the induction of IPTG (0.8 mmol/L) at 30°C for 4 hours. The solubility of the expressed products was tested by PAGE electrophoresis of supernatant and precipitation separately resulted from smashed bacterial. The results indicated that the protein was in inclusion body and insoluble. The precipitation of smashed bacterial including the recombinant protein was washed with 1×binding buffer including 2M urea, resolved in 1×binding buffer including 6 M urea at 37°C for 1h, purified with His bind column and then renatured by dialysis. The purity was tested by PAGE electrophoresis and western blot, which confirmed the high purity of the recombinant protein of MaTf obtained. The biological activity of anti-microbial was tested in vitro by assessing the effect on bacterial growth repression. According to the diameter of repressed bacteria circle on plate for equal dose of purified protein, the antibacterial effects to three kind of bacteria tested are different, which are *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Serratia marcescens*. The expression pattern in different tissues in *M. mutica* were quantified by western blot, which showed that the pattern at protein level is similar to the mRNA level, which is: liver > spleen > kidney > heart. This research provides an important information for exploring the biological function of transferrin in non-specific immune response.

Key words: Asian Yellow Pond Turtle; Transferrin; Recombinant Expression; Antibacterial