卤虫泌壳腺特异表达蛋白 SGEG1 的原核表达

张　梦[1]，沈帅祺[1]，徐海晶[1]，钱国英[1]，马文明[1]，王志江[2]

（1. 浙江万里学院生物与环境学院，浙江宁波　315100；
2. 浙江医药高等专科学校制药工程学院，浙江宁波　315100）

摘要：研究将卤虫泌壳腺特异表达基因 1（shell gland-specifically expresses gene 1，*SGEG1*）的成熟肽序列克隆到带有 6×His 标签的原核表达载体 pET-28α(+)中，构建含 pET-28α(+)-SGEG1 的重组质粒，转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）中，诱导表达重组蛋白。通过对诱导的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）浓度、诱导时间和蛋白电泳检测方式的优化，确定最佳表达条件和蛋白电泳检测方法。本研究成功构建了 pET-28α(+)-SGEG1 重组载体，实现了分子量约为 10 ku 的小分子重组 SGEG1 蛋白的高效表达，其融合蛋白主要以包涵体形式存在，为开展 SGEG1 蛋白的体外制备奠定了基础。

关键词：生物工程；卤虫 SGEG1；原核表达；融合蛋白
中图分类号：Q786　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-2850(2019)04-0649-07

Prokaryotic expression of SGEG1 protein from *Artemia* diapause cysts

ZHANG Meng[1], SHEN Shuaiqi[1], XU Haijing[1], QIAN Guoying[1], MA Wenming[1], WANG Zhijiang[2]

(1. *College of Biological and Environmental Sciences*, *Zhejiang Wanli University*, *Ningbo*, *Zhejiang*　315100, *China*;
2. *College of Pharmaceutical Engineering*, *Zhejiang Pharmaceutical College*, *Ningbo*, *Zhejiang*　315100, *China*)

Abstract: In this study, the *SGEG1* (shell gland-specifically expresses gene 1) sequence of deduced mature peptide was cloned into the prokaryotic expression vector pET-28α(+) with 6×His tag. A recombinant plasmid containing pET-28α(+)-SGEG1 was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The fusion expression of recombinant SGEG1 (rSGEG1) protein was induced. By optimizing the induced IPTG concentration, induction time and the protein electrophoresis detection method, the optimal expression conditions and protein electrophoresis detection method were determined. The successfully constructed recombinant pET-28α(+)-SGEG1 with a molecular weight of about 10 ku was highly expressed, and the fusion protein mainly existed in the form of inclusion body, which supported a foundation for the preparation of SGEG1 protein *in vitro*.

Key words: bioengineering; *Artemia* SGEG1; prokaryotic expression; fusion protein

0　引言

卤虫也称盐水丰年虫或丰年虾，属于节肢动物门，是一种在休眠状态下能度过极端恶劣环境的小型海洋动物。卤虫有两种生殖方式，即卵胎生和卵生。卵胎生是指子代自母体内产出时已孵化为无节幼体，

基金项目：国家自然科学基金（31872545）；国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项（2018YFD0900200）；浙江省“生物工程”一流学科开放基金（CX2018003，ZS2017002）；浙江省大学生科技创新活动计划（新苗人才计划）（2019R420021）；浙江省农业（水产）新品种选育重大科技专项（2016C02055-2，2016C02055-5）
作者简介：张梦（1992—），女，硕士研究生，主要研究方向：水生生物营养生理及分子调控
通信联系人：马文明，副研究员，主要研究方向：甲壳动物的性别调控机理. E-mail: m-wm02@163.com

而卵生则指子代以卵的方式自母体内产出[1]。当外界环境条件较差时，卵生途径的卤虫产生休眠卵，其可在长期缺氧、脱水、极端温度和γ-射线等条件下，依然保持很高的活力和孵化率[1~3]。卤虫休眠卵孵化后的无节幼体是鱼、虾、蟹等水产养殖过程中广为使用的活体饵料，具有重要的经济价值。

卤虫休眠卵外层为复杂的非细胞卵壳，与其细胞内部的p26、Artemin等因子一起形成特有的抗逆机制[2~7]。*SGEG*是仅存在于卵生途径卤虫的卵囊泌壳腺分泌型细胞上的特异性表达基因，其编码的蛋白是卤虫休眠卵壳蛋白的重要组成部分，参与休眠卵对极端环境的抗逆机制[8~9]。*SGEG1*基因是卤虫*SGEG*基因家族的成员之一，其cDNA全长450 bp，具有345 bp开放阅读框，推演的多肽由33个氨基酸信号肽和81个氨基酸成熟肽组成[10~11]，其对卤虫卵壳高度有序的组装及参与保护休眠胚胎免受各种极端环境的胁迫有重要意义。

本研究将卤虫*SGEG1*基因成熟肽序列克隆到带有6×His标签的原核表达载体pET-28α(+)中，进行蛋白诱导和体外表达，优化SGEG1重组蛋白最佳诱导条件和电泳检测方式，以实现目的蛋白的高效表达和体外制备。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Taq DNA聚合酶、DNA分子量标准、蛋白分子量标准、卡那霉素、蛋白胨、酵母粉、40%丙烯酰胺-甲叉丙烯酰胺溶液（体积比为29:1）、尿素、IPTG、蛋白电泳缓冲液、DNA胶回收试剂盒、PCR产物回收试剂盒、质粒DNA小量抽提试剂盒等购自生工生物工程（上海）股份有限公司。T4 DNA连接酶、*Nco* Ⅰ和*Xho* Ⅰ购自TaKaRa公司。pET-28α(+)质粒、*E. coli* DH5α和*E. coli* BL21（DE3）菌种为实验室保存。凝胶成像系统购自杭州宝诚生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 pET-28α(+)-SGEG1原核表达载体的构建

根据GenBank中*SGEG1*基因cDNA序列（基因序列号为EU683079.1）及原核表达载体pET-28α(+)的多克隆位点序列，设计带有酶切位点的PCR扩增引物：上游引物SGEG1-F：5′-CATGCCATGGGGAAGAAGAAGGAAAAGATTACGGA-3′（下划线处为*Nco* Ⅰ酶切位点）；下游引物SGEG1-R：5′-CCGCTCGAGCAGGTCTCTCCCCTGGTCTT-3′（下划线处为*Xho* Ⅰ酶切位点），扩增SGEG1成熟肽序列。同时，在下游引物紧邻终止密码子的3′端引入编码6个组氨酸的核酸序列，表达由91个氨基酸组成的重组蛋白。

尕海孤雌卤虫（*Artemia parthenogenetica*）用于RNA的提取和cDNA的合成。利用PCR方法，扩增SGEG1的成熟肽序列。PCR反应条件：94℃预变性5 min；94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸1 min，35个循环；72℃延伸10 min. PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测分析，并用PCR产物试剂盒纯化备用。

SGEG1纯化产物和pET-28α(+)载体分别用*Nco* Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切，酶切产物纯化后经T4 DNA连接酶16℃连接过夜，转化至*E. coli* DH5α中，挑选阳性克隆进行测序，确定目的片段序列及读码框的正确性。

1.2.2 重组SGEG1蛋白的诱导表达

将含有pET-28α(+)-SGEG1重组质粒的*E. coli* BL21（DE3）接种于含卡那霉素（终浓度为30 μg/mL）

的 LB 液体培养基中，37℃ 200 r/min 培养过夜，随后按 1:50 的比例（体积比）扩大培养至 OD_{600}=0.4～0.6，加入 IPTG 诱导表达目的蛋白。诱导表达后的菌液，4℃ 5 000 r/min 离心 10 min，收集菌体沉淀。在溶菌酶的作用下，37℃作用 30 min；随后转至液氮中 30 s，37℃水浴 2 min 反复冻融 6 次，加入 Triton X-100（终浓度为 2%）室温间隔震荡 30 min，彻底破碎菌体。离心分别收集上清和沉淀，十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）检测目的蛋白的表达和存在形式。

1.2.3 确定蛋白诱导的最佳 IPTG 浓度

将表达菌的菌液培养至 OD_{600}=0.4～0.6 时，等量分装至 4 瓶，分别加 IPTG 至终浓度为 0，0.4，0.8，1.0 mmol/L，37℃诱导培养 4 h，4℃ 5 000 r/min 离心 10 min，收集菌体沉淀，用 SDS-PAGE 分析，确定最佳诱导浓度。

1.2.4 确定蛋白表达的最佳诱导时间

将表达菌的菌液培养至 OD_{600}=0.4～0.6 时，等量分装至 3 瓶，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，37℃诱导培养，分别在诱导的 0，2，4 h 取菌液进行 SDS-PAGE 检测，确定最佳诱导时间。

1.2.5 确定蛋白的最优电泳条件

重组表达的 SGEG1 蛋白为小分子多肽，分别利用 4 种不同的蛋白电泳方式，优化目的蛋白的分离效果。将样品分别置于 15% SDS-PAGE（5%浓缩胶、15%分离胶）、15% SDS-PAGE（含 6 mol/L 尿素）、16% Tricine SDS-PAGE（6%浓缩胶、16%分离胶）和 16% Tricine SDS-PAGE（含 6 mol/L 尿素）体系中进行蛋白分离。其中，15% SDS-PAGE 采用恒流 15 mA，2 h 电泳。Tricine SDS-PAGE 缓冲液则采用阳极和阴极电泳缓冲体系，先恒压 30 V，30 min 电泳，待样品进入分离胶后电压升为恒压 200 V，电泳 2 h. 电泳结束后，考马斯亮蓝 R-250 染色，脱色，凝胶成像系统拍照观察。

2 实验与分析

2.1 pET-28α(+)-SGEG1 原核表达载体的构建

卤虫 SGEG1 多肽由信号肽和成熟肽两部分组成，将卤虫 *SGEG1* 的成熟肽基因序列克隆到带有 6×His 标签的原核表达载体 pET-28α(+)中进行蛋白表达（如图 1a 所示）。

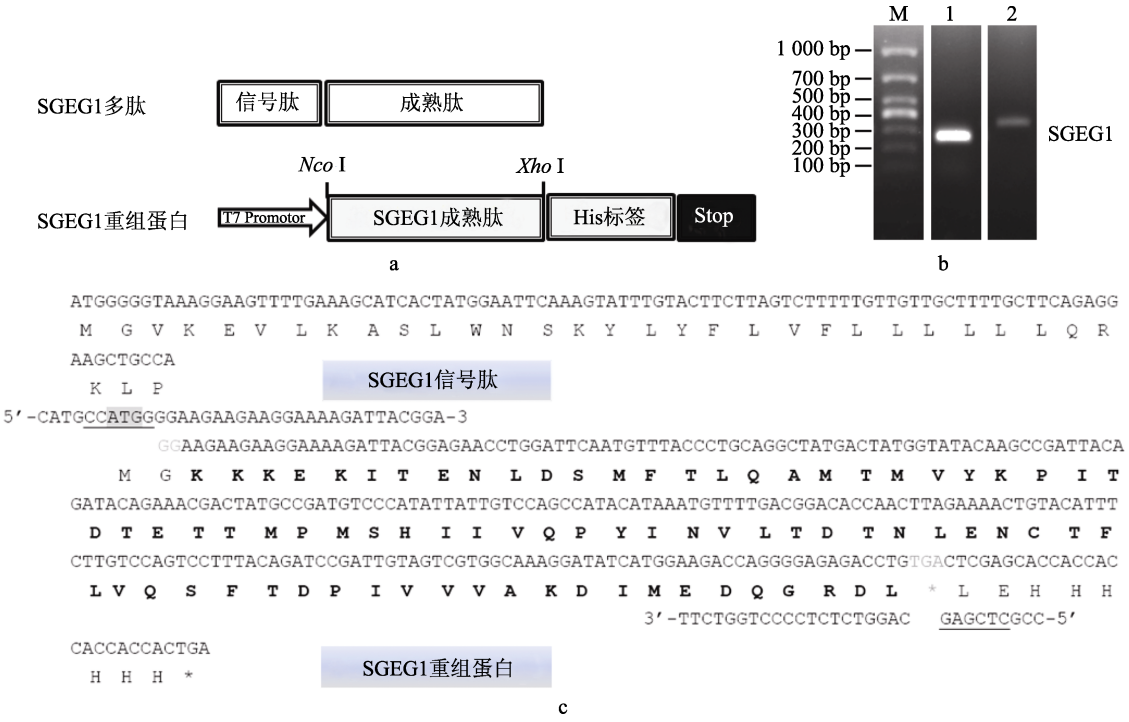
首先，以卤虫 cDNA 为模板，利用 PCR 扩增 SGEG1 成熟肽片段，在约 270 bp 处得到一条单一的特异性条带（如图 1b 条带 1 所示）。随后，利用 pET-28α(+)质粒，将 SGEG1 成熟肽序列定向插入，构建重组表达载体 pET-28α(+)-SGEG1，并转化至 *E. coli* 中。利用 PCR 方法，进行转化子的鉴定，结果表明成功扩增到转化子中的目的基因（如图 1b 条带 2 所示）。此转化子质粒 DNA 测序后，证实其与预期基因序列相符，表明成功构建重组表达载体。

体外重组表达的 SGEG1 多肽含成熟肽和组氨酸标签两部分，组成一个由 91 个氨基酸组成的小分子多肽，推演的蛋白分子量为 10.537 ku，等电点为 5.69（如图 1c 所示）.

2.2 重组 SGEG1 蛋白的诱导表达与检测

重组 pET-28α(+)-SGEG1 质粒转化至 *E. coli* BL21（DE3）中，利用 IPTG 对其进行诱导，收集产物进行 SDS-PAGE 检测。结果显示，与未经 IPTG 诱导的菌体相比，经 IPTG 诱导后的菌体在约 10 ku 处出现一条明显条带，与预期 SGEG1 重组蛋白大小一致，表明构建的 pET-28α(+)-SGEG1 重组质粒已成功在

大肠杆菌中表达。同时，对重组蛋白的可溶性分析结果显示，在大肠杆菌破菌后的菌体沉淀中同样存在一条约 10 ku 大小的蛋白条带，说明 SGEG1 重组蛋白主要以包涵体的形式存在（如图 2 所示）。



注：图 b 中，M—DNA 分子量标准，下同；1—*SGEG1* 基因 PCR 产物；2—pET-28α(+)-SGEG1 转化子的 PCR 产物

图 1 SGEG1 重组蛋白的原核表达载体构建

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression vector of rSGEG1 protein

a—SGEG1 重组蛋白的原核表达策略；b—*SGEG1* 基因的 PCR 产物检测：c—SGEG1 重组蛋白氨基酸序列

a-Prokaryotic expression strategy of rSGEG1 protein; b-Detection of PCR products of *SGEG1* gene; c-Amino acid sequence of rSGEG1 protein

2.3 SGEG1 重组蛋白的表达条件优化

2.3.1 最佳诱导浓度的确定

分别以浓度为 0，0.4，0.8，1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达并检测分析。蛋白电泳结果表明，IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 时，SGEG1 的表达量较低，随着 IPTG 浓度的逐渐升高，SGEG1 蛋白的表达量呈现上升趋势（如图 3 所示）。因此，选择终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。

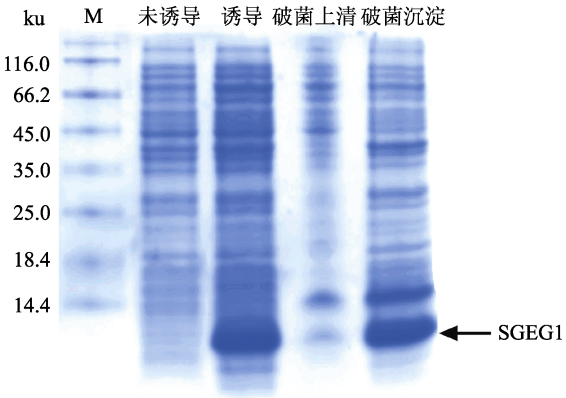


图 2 SGEG1 重组蛋白的诱导表达和可溶性分析

Fig. 2 Induced expression and soluble analysis of rSGEG1 protein

2.3.2 最佳诱导时间的确定

将含有 pET-28α(+)-SGEG1 的 *E. coli* BL21（DE3）表达菌培养至对数生长期，以终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 分别诱导 0，2，4 h 后电泳检测。结果表明，随着 IPTG 诱导时间的增加，SGEG1 重组蛋白的表达量逐渐增加（如图 4 所示）。因此，SGEG1 重组蛋白最优表达条件为 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h.

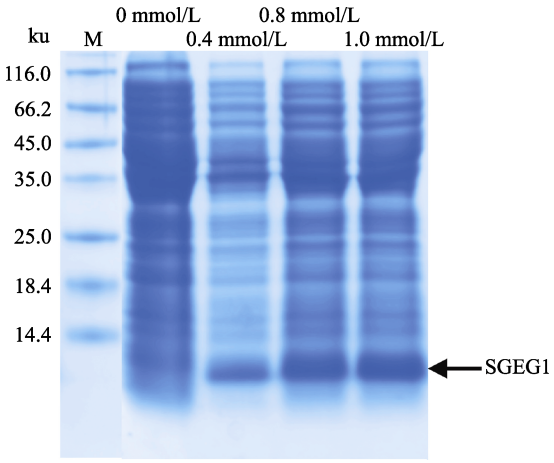


图 3 不同 IPTG 诱导浓度对重组蛋白表达量的影响

Fig. 3 Effect of different concentration of IPTG on the expression of recombinant protein

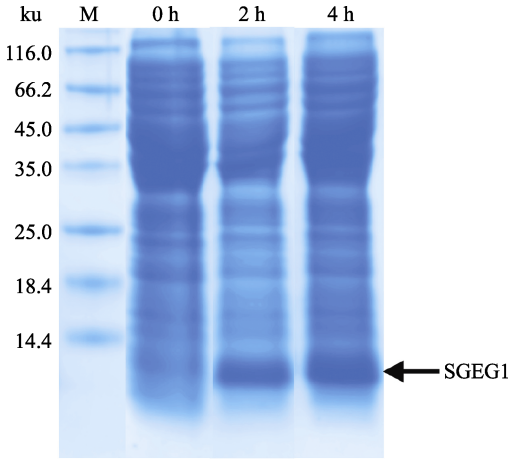


图 4 不同诱导时间对重组蛋白表达量的影响

Fig. 4 Effect of different induction time on the expression of recombinant protein

综上所述，SGEG1 重组蛋白的最优表达条件为：菌液浓度 OD_{600}=0.4～0.6 时进行诱导，IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L，37℃诱导 4 h.

2.4 重组 SGEG1 蛋白的电泳条件优化

重组表达的 SGEG1 蛋白分子量为 10.537 ku，属于小分子肽，常用的蛋白电泳较难实现预期的分离效果。在本研究中，分别采用 15% SDS-PAGE、15% SDS-PAGE（含尿素）、16% Tricine-SDS-PAGE 和 16% Tricine-SDS-PAGE（含尿素）4 种方法对菌体蛋白进行分离，如图 5 所示。通过对比蛋白电泳结果，挑选最适合分离 SGEG1 蛋白的电泳和检测方法。

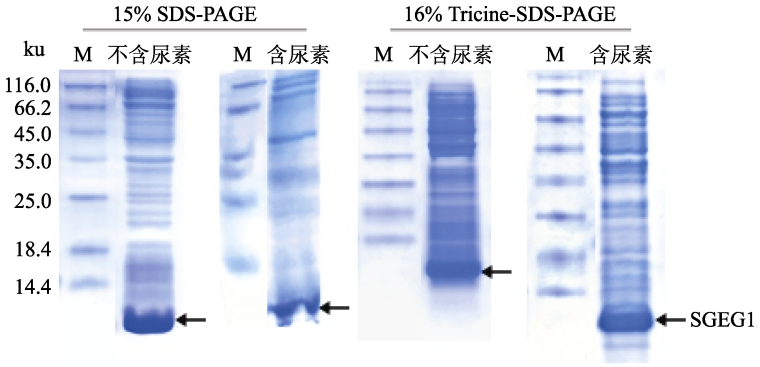


图 5 4 种蛋白电泳分离效果的比较

Fig. 5 Comparison of separation effects of four kinds of protein electrophoresis

由图 5 可见，15% SDS-PAGE 电泳方法可以很好地分离 20 ku 以上的蛋白条带，条带边界清晰，效果理想；20 ku 以下的条带则呈模糊团状聚集，小分子条带的分离效果不理想。而 15% SDS-PAGE（含尿素）电泳条带呈现跑偏情况，且蛋白区条带弥散，未能很好地分离蛋白。因此，15% SDS-PAGE 的电泳方式不适用于重组 SGEG1 蛋白的分离和检测。

另一方面，利用 Tricine 代替甘氨酸，借助两性离子缓冲液，进行 16% Tricine-SDS-PAGE. 电泳结果表明，该方法能有效分离样品中不同分子量大小的蛋白且条带清晰，分离效果较 15% SDS-PAGE 方法有明显改善。在此基础上，利用 16% Tricine-SDS-PAGE（含尿素）方法，可以很好地分离不同片段大小的

蛋白，且在小分子蛋白区域的条带边界清晰，对小分子肽分离效果最佳。而且，在相同的电泳时间条件下，含尿素的凝胶分离速度更快，分离效果更好，可以很好地解决 16% Tricine-SDS-PAGE 过程中产热高和电泳速度较缓的问题。

综上所述，重组 SGEG1 蛋白最优的电泳分离和目的蛋白检测方法是 16% Tricine-SDS-PAGE（含尿素），其可以高效、便捷地分离菌体蛋白且可以获得条带清晰的目的蛋白条带。

3 讨论与结论

卤虫泌壳腺特异表达蛋白 SGEG1 是休眠卵壳蛋白的重要组成部分，在卤虫卵壳形成过程中发挥着重要的功能，参与卤虫在极端环境中的抗逆休眠机制。*SGEG1* 基因由刘玉磊等[8~9]等发现，推测与卤虫休眠卵壳形成相关。代莉等[10~11]利用 RNAi 技术研究发现，由沉默 *SGEG1* 基因的母体卤虫产出的休眠卵前皮质层消失、皮质层厚度仅为正常休眠卵的一半，推测 SGEG1 分散性表达于前皮质层和皮质层，参与卤虫休眠卵卵壳的构建。

本研究以卤虫 cDNA 为模版，选用 pET 原核表达载体，借助 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性内切酶，成功构建了高效表达卤虫 SGEG1 多肽的 pET-28α(+)-SGEG1 原核表达载体。同时，通过 *E. coli* BL21（DE3）菌株的诱导表达，获得 SGEG1 重组蛋白，并证明其主要以包涵体的形式存在，为高效获取 SGEG1 重组蛋白提供了基础资料，为后期纯化及相关功能研究奠定了基础。

同时，为高效表达 SGEG1 重组蛋白，对原核表达诱导条件进行了优化。IPTG 诱导剂价格较为昂贵，且对细菌存在一定毒性。延长诱导时间可以使蛋白表达量升高，但也可能使蛋白降解和菌体老化，反作用于蛋白表达量。本实验通过对 SGEG1 重组蛋白诱导的 IPTG 浓度和诱导时间进行探索，确定了 SGEG1 重组蛋白最优表达条件为菌液浓度在 OD_{600}=0.4～0.6 时进行诱导，IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L，37℃诱导 4 h.

SDS-PAGE 常用于分离蛋白质，普通的 Tris-甘氨酸-SDS-PAGE 多用于分离分子量在 10～200 ku 的蛋白质，当分离分子量小于 10 ku 的小分子肽时，其效果欠佳。本研究中推演的 SGEG1 重组蛋白分子量为 10.537 ku，常用的 SDS-PAGE 并不是很适用。而 Tricine-SDS-PAGE 常用于分离分子量为 1～10 ku 的小分子肽类，Tricine 以阳离子形式存在，可以作为拖尾离子，使小分子多肽能够在浓缩胶中形成尽可能窄的带[12~15]。同时，在蛋白电泳中加入尿素能够明显改善小分子肽的分离效果，提高分辨率[16]。通过对常规的 SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 电泳进行改进，在电泳的分离胶中加入尿素，可以改变胶的孔径，有效压缩小分子多肽，减弱拖尾现象[16]。在本研究中，通过对 4 种蛋白电泳方法的比较，可为小分子肽的高效分离提供良好的技术支持。

卤虫 SGEG1 重组表达蛋白的成功制备为进一步研究卤虫休眠卵卵壳蛋白的功能以及卤虫的滞育、抗逆机理打下基础，为开发隔离紫外线、耐腐蚀、耐高温的新型生物材料提供了新思路。

[参考文献] (References)

[1] CLEGG J S, CONTE F P. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*[M]//PERSOONE G, SORGELOOS P, ROELS O, et al. The Brine Shrimp Artemia, vol. 2. Wetteren: Universa Press, 1980: 11-54.

[2] MacRAE T H. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*[J]. Cell Stress and Chaperones, 2016, 21(1): 9-18.

[3] CLEGG J S. Stress-related proteins compared in diapause and in activated, anoxic encysted embryos of the animal extremophile, *Artemia franciscana*[J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(5): 660-664.

[4] ZHOU R, SUN Y X, YANG W J, et al. Identification and characterization of a Ste20-like kinase in *Artemia* and its role in the

developmental regulation and resistance to environmental stress[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92234.

[5] MALITAN H, COHEN A M, MacRAE T H. Knockdown of the small heat shock protein, p26 by RNA interference modifies the diapause proteome of *Artemia franciscana*[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2019, 8: doi: 10.1139/bcb-2018-0231.

[6] TAN J, MacRAE T H. Stress tolerance in diapausing embryos of *Artemia franciscana* is dependent on heat shock factor 1 (Hsf1)[J]. PLoS One, 2018, 13(7): e0200153.

[7] MA W M, LI H W, DAI Z M, et al. Chitin-binding proteins of *Artemia* diapause cysts participate in formation of the embryonic cuticle layer of cyst shells[J]. The Biochemical Journal, 2013, 449(1): 285-294.

[8] 刘玉磊. 卤虫休眠卵壳形成的分子机制及其抗逆功能的研究[D]. 杭州：浙江大学，2009.
LIU Y L. The molecular mechanism of formation of diapause cyst shell in brine shrimp, *Artemia parthenogenetica* and its resistance role in environment stresses[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009. (in Chinese)

[9] LIU Y L, ZHAO Y, DAI Z M, et al. Formation of diapause cyst shell in brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*, and its resistance role in environmental stresses[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(25): 16931-16938.

[10] 代莉. 卤虫休眠卵壳蛋白及其参与卤虫胚胎的抗逆性机制研究[D]. 杭州：浙江大学，2012.
DAI L. Extracellular matrix peptides of *Artemia* cyst shell participate in protecting encysted embryos from extreme enviroments[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012. (in Chinese)

[11] DAI L, CHEN D F, LIU Y L, et al. Extracellular matrix peptides of *Artemia* cyst shell participate in protecting encysted embryos from extreme environments[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20187.

[12] 王旭，何冰芳，李霜，等. Tricine-SDS-PAGE 电泳分析小分子多肽[J]. 南京工业大学学报（自然科学版），2003，25（2）：79-81.
WANG X, HE B F, LI S, et al. Analysis of low molecular peptides by Tricine-SDS-PAGE[J]. Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition), 2003, 25(2): 79-81. (in Chinese)

[13] 曹佐武. 有效分离 1 kDa 小肽的 Tricine-SDS-PAGE 方法[J]. 中国生物工程杂志，2004，24（1）：74-76.
CAO Z W. An effective method of Tricine-SDS-PAGE for separating the 1 kDa peptide[J]. China Biotechnology, 2004, 24(1): 74-76. (in Chinese)

[14] SCHÄGGER H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nature Protocols, 2006, 1: 16-22.

[15] 石继红，赵永同，张英起，等. 应用 SDS-PAGE 显示小分子多肽技术的探讨[J]. 生物工程进展，2001，21（1）：38-41.
SHI J H, ZHAO Y T, ZHANG Y Q, et al. Study on analysing methods of low molecular peptides with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Progress in Biotechnology, 2001, 21(1): 38-41. (in Chinese)

[16] 曹佐武. 尿素改善 SDS-PAGE 分离小分子肽的效果[J]. 生物技术，2003，13（5）：23-24.
CAO Z W. Urea improves the SDS-PAGE results of low molecular peptides[J]. Biotechnology, 2003, 13(5): 23-24. (in Chinese)

（责任编辑：李曦）