

上海研究生学术论坛

论文集

食品·营养·健康·安全

主办：上海市学位委员会

承办：上海水产大学

目 录

交流论文:

- 1、总状毛霉 (*Mucor racemosus*) 甲壳素脱乙酰酶全长 cDNA 的克隆及序列分析
..... 蒋霞云、周培根 (上海水产大学) (1)
- 2、黄鳍鲷骨骼肌 α ——辅肌动蛋白的分离纯化及抗体制备
..... 杜雪莉、梁银龙、王锡昌、苏文金、曹敏杰 (上海水产大学) (8)
- 3、南美白对虾养殖水体三株疑似病原菌的分离与初步鉴定
..... 韩 丽、潘迎捷、赵 勇、孙晓红 (上海水产大学) (14)
- 4、环境应激下 *Pichia stipitis* 酵母形态性能与蛋白的差异
..... 方 波、史 萍、许学书、王宇晓 (华东理工大学) (20)
- 5、同时蒸馏萃取和固相微萃取与气相色谱——质谱法分析洋葱的挥发性风味成分
..... 王依春、王锡昌 (上海水产大学) (25)
- 6、真空度对卷心菜真空冷却的影响
..... 韩 志、谢 晶 (上海水产大学) (31)
- 7、鲑精蛋白基因工程菌高效表达条件的优化
..... 鲁健章、王春晓、刘承初、邓 强、郑其丽 (上海水产大学) (36)
- 8、冻干物料内部孔隙率影响因素的研究
..... 肖 鑫、陶乐仁 (上海理工大学) (42)
- 9、乳清分离蛋白酶解物的抗氧化活性研究
..... 刘志东、郭本恒、王荫愉、吴正钧 (上海水产大学) (49)
- 10、秋刀鱼盐干品制造过程中理化变化的阐明
..... 于 慧、佐藤实、王锡昌 (上海水产大学) (55)
- 11、鲢鱼鱼肉再组织化的复合条件的研究
..... 肖作为 (上海水产大学) (64)
- 12、夏季和冬季白鲢鱼糜肌球蛋白的交联反应特性初探
..... 王金余、赵善贵、袁春红、刘承初、陈舜胜、今野久仁彦 (上海水产大学) (73)
- 13、基于 RFID 技术的食品安全流通问题研究
..... 梅圣安、钟艳萍 (上海财经大学) (83)

投稿论文:

1、食品材料热导率的实验研究及理论预测进展	谢 堃、陈天及、徐 瑛、朱 恺 (上海水产大学) (91)
2、非洲菊切花流通过程中贮藏工艺的研究	常大伟、谢 晶 (上海水产大学) (97)
3、三种淡水养殖鱼鱼卵的营养价值评价	代忠波、丁卓平、刘承初、余从田 (上海水产大学) (102)
4、牛乳铁蛋白抗菌肽功能基因的克隆与表达质粒构建	邓 强、鲁健章、张京佶、王春晓、刘承初 (上海水产大学) (106)
5、马铃薯膳食纤维理化和生理功效评价	王 卓、顾正彪、洪 雁 (江南大学食品学院) (112)
6、液相色谱法测定猪和牛脂肪中孕酮残留量	姜 维、陶宁萍、方晓明、唐毅锋、庞国芳 (上海水产大学) (118)
7、人参对烹调剩油致果蝇寿命及脂质过氧化的拮抗作用	白莉华 (同济大学) (123)
8、喷雾干燥法制取宝石鱼油微胶囊技术的研究 (I)	康 吟、陶宁萍、王锡昌 (上海水产大学) (130)
9、酶法制备苦荞多肽的研究	周小理、李红敏、刘翔海、张正强 (上海水产大学, 上海应用技术学院) (135)
10、吸附交联法和包埋法固定壳聚糖酶的比较研究	潘晓榕、王 艳、周培根 (上海水产大学) (141)
11、壳聚糖与糖美拉德反应产物及其抗氧化性能研究	王惠英、孙 涛、周冬香、毛 芳 (上海水产大学) (147)
12、细胞膜通透性调节在发酵代谢中的重要性	魏 娜、李柏林、欧 杰 (上海水产大学) (154)
13、顶空固相微萃取与气质联用法分析草菇中的香味成分	温 泉、王锡昌 (上海水产大学) (159)
14、测定有机磷农药乙酰胆碱酯酶生物传感器的研究	袁金凤、王朝瑾 (上海水产大学) (165)
15、海洋微生物酶的研究进展概况	张 慧、宁喜斌 (上海水产大学) (170)

16、转谷氨酰胺酶及非肉蛋白在重组碎羊肉卷加工中的作用效果研究
..... 张亚琼（上海水产大学）(176)

17、羊栖菜多糖的抗凝血活性研究
..... 张喆述、刘承初（上海水产大学）(184)

18、水产品中氯霉素残留检测方法研究进展
..... 章 献、赵 勇（上海水产大学）(193)

19、食品冷链流通现状及对策
..... 周 然、莫 云、黄 琛、李云飞（上海交通大学机械动力学院）(199)

20、豆酸奶的制作及其发酵条件优化
..... 张 青（上海水产大学）(202)

21、高蛋白牛奶生产工艺的研究
..... 崔 艳（上海水产大学）(213)

22、真空冷冻干燥技术在水产品加工中的应用
..... 徐 瑛、陈天及、谢 堃（上海水产大学）(224)

23、苯酚硫酸法和间接碘量法测定灵芝多糖含量比较研究
..... 赵阳楠、常继东（华东理工大学）(232)

24、米曲霉蛋白酶动力学特性的研究
..... 张 青、许学书、梁晓声（华东理工大学）(238)

25、茶多糖简介及从茶叶中提取茶多糖实验
..... 郭艳红（上海师范大学）(247)

26、环介导等温扩增技术及其应用
..... 徐 芊、孙晓红、赵 勇、潘迎捷（上海水产大学）(252)

27、采珠后三角帆蚌肉分离蛋白提取和性质测定
..... 周海燕、李应森、刘承初（上海水产大学）(259)

28、分子生物学应用于微生物多样性的研究进展
..... 陈 昱、潘迎捷、赵 勇、孙晓红（上海水产大学）(269)

29、食品保藏过程中抑制腐败微生物滋生的方法
..... 丁 莹（上海水产大学）(273)

30、鲑精蛋白基因克隆与融合蛋白表达系统的构建
..... 鲁健章、王春晓、刘承初、邓 强、刘景晶（上海水产大学）(280)

31、酸性果乳饮料的稳定性控制
..... 栗 星（上海水产大学）(285)

32、海藻中的生理活性物质的研究
..... 陆 魏、周培根、吴文惠（上海水产大学）(294)

33、梨枣在减压贮藏过程中生理变化的研究
..... 杨怀玉、周培根（上海水产大学）(302)

34、牛乳香槟的研制
..... 李 伟（南京农业大学食品科技学院）(308)

35、姜风味精华物质——姜乳膏提取工艺的研究
..... 孔淑华、段元斐（华东理工大学）(315)

36、水产品安全与微生物预测技术
..... 王璐华、宁喜斌（上海水产大学）(320)

37、黄鳍金枪鱼肉在不同冻藏温度下品质变化的动力学研究
..... 路 昊、包建强（上海水产大学）(324)

本次活动得到“上海市重点学科建设项目——食品科学与工程”资助（No: T1102）

总状毛霉（*Mucor racemosus*）甲壳素脱乙酰酶全长 cDNA 的克隆及序列分析*

蒋霞云，周培根

（上海水产大学食品学院，上海，200090）

摘要：用保守的特异引物进行PCR扩增，结合RACE技术，分离和克隆到了总状毛霉（*Mucor racemosus*）甲壳素脱乙酰酶(CDA)的全长cDNA，并进行了全序列测定，提交GenBank（DQ538514）。研究表明：（1）总状毛霉CDA基因全长为1506 bp，包括67 bp 5'非翻译区，1344 bp阅读框以及95bp 3'非翻译区，3'非翻译区包含Poly (A) 加尾信号AATAAA。总状毛霉的CDA基因共编码448个氨基酸，在该基因中部还包含一个144氨基酸的多糖脱乙酰酶结构域，约占CDA基因全长的32%。（2）总状毛霉CDA基因与其它相近种米根霉（*Rhizopus oryzae*）、卷柄根霉（*Rhizopus circinans*）的CDA1和CDA2、鲁氏毛霉（*Mucor rouxii*）、卵形孢球托霉（*Gongronella butleri*）、匍枝根霉（*Rhizopus stolonifer*）、布拉克须霉（*Phycomyces blakesleeanus*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的CDA1和CDA2的基因序列同源性分别为：75%、58%、56%、56%、48%、39%、39%、17%和16%；相应的氨基酸序列的同源性分别为：69%、57%、59%、55%、47%、30%、32%、18%和21%。表明CDA基因在不同的真菌中有着不同的亲缘关系。（3）根据总状毛霉CDA基因的氨基酸序列构建的不同真菌的系统树，与采用经典分类法构建的系统树基本一致。（4）通过生物信息学的方法，预测该基因所编码的蛋白质三级结构，验证了该蛋白质具有甲壳素脱乙酰酶完整的功能性结构，并包含一个多糖脱乙酰酶结构域，两者具有相似的空间结构。

关键词：快速扩增cDNA末端；甲壳素脱乙酰酶；总状毛霉；系统发生

Cloning and Sequence Analysis Complete cDNA of Chitin Deacetylase from *Mucor racemosus*

JIANG Xia-Yun, ZHOU Pei-Gen

(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A complete chitin deacetylase (CDA) cDNA from *Mucor racemonus* was cloned and sequenced by using RT-PCR and RACE with special conserved primers. The cDNA sequence was submitted to GenBank (DQ538514). The results showed: (1) The complete cDNA was with length of 1506bp contains 67bp 5'-untranslated region, an open reading frame of 1344bp and 95bp 3'-untranslated region including tailing site AATAAA. The gene encoded a sequence of 448 amino acid residues and consisted of core nucleotides encoding a polysaccharide deacetylase domain which covering 32 percentage of the entire sequence. (2) The CDA gene shared different sequence homology with those of fungi including *Rhizopus oryzae* (75%), CDA1(58%) and CDA2(56%) of *Rhizopus circinans*, *Mucor rouxii*(56%), *Gongreonella bulteri*(48%), *Rhizopus stolonifer*(39%), *Phycomyces blakesleeanus*(39%), CDA1(17%) and CDA2(16%) of *Saccharomyces cerevisiae*. The corresponding homology of the deduced amino acid sequences was 69%, 57%, 59%, 55%, 47%, 30%, 32%, 18% and 21%, respectively. (3) Phylogenetic analysis according to the deduced amino acid sequences was marched with the classical taxonomic classification of the fungi. (4) The 3-D-structure of this protein was predicted. The protein had a whole CDA functional domain and a polysaccharide deacetylase domain.

Keywords: RACE; chitin deacetylase (CDA); *Mucor racemonus*; phylogenetic analysis

* Cloning and Sequence Analysis Complete cDNA of Chitin Deacetylase from *Mucor*

壳聚糖 (Chitosan) 是甲壳素 (Chitin) 经过脱乙酰基反应后的产物, 壳聚糖可溶于乙酸等水溶液, 已广泛应用于工业、农业、化妆品、医药、膜材料和其他环保、健康领域。目前, 工业生产壳聚糖主要采用化学法, 即以甲壳素为原料, 用 40% 以上的氢氧化钠来进行脱乙酰基反应, 存在环保、生态等诸多严重问题。

甲壳素脱乙酰酶 (Chitin Deacetylase, E.C.3.5.1.41), 简称 CDA, 是一种催化甲壳素中 N-乙酰基-葡萄糖胺的乙酰胺基水解的酶, 可应用于壳聚糖的制备。自 1974 年 Araki 等首次从真菌鲁氏毛霉 (*Mucor rouxii*) 培养液中分离得到甲壳素脱乙酰酶, 以后陆续从真菌的接合菌纲、半知菌纲以及植物病原体中均发现有甲壳素脱乙酰酶的存在。目前, 国内外学者已对甲壳素脱乙酰酶的来源、特性、生物学功能^[1]和基因组成及其表达^[2,3]等方向开展了基础性研究^[4]。

我们通过比较了几种霉菌 (毛霉、根霉、曲霉和青霉) 在对数生长末期和稳定期末期的胞内和胞外甲壳素脱乙酰酶的活力, 发现处于对数生长期末期的总状毛霉胞外酶活力最高, 达到了 97.2 ± 4.2 U/g 干菌丝体^[5]。因此, 本文提取处于对数生长期的总状毛霉的菌丝体, 采用 3' 和 5' RACE 技术, 进行了总状毛霉甲壳素脱乙酰酶全长 cDNA 的克隆, 并对该基因的序列进行了分析, 为今后进行该基因的可控表达和生物学功能分析奠定了基础。目前, 总状毛霉甲壳素脱乙酰酶全长 cDNA 的克隆在国内外尚未见报道。

1. 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

总状毛霉 (*Mucor racemosus*) 菌株由本实验室分离、纯化并保存;

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工; RTase M-MLV (RNase H⁻)、RNase H、TdT 加尾酶、pMD19-T 载体和 T4 连接酶为 TaKaRa 公司产品; Taq 酶购自天为时代; dNTP 混合物、dATP、RNase Inhibitor 为生工产品; 胶回收试剂盒购自上海申能博彩; 所有引物委托上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的抽提

取对数生长期的总状毛霉菌液, 离心, 称重, 用超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色显示 28 S 和 18 S, 检测 RNA 的完整性。

1.2.2 3' 端第一链cDNA的合成

参照《分子克隆实验指南》^[6], 采用 20 μ l RT 反应体系: 1 μ l 模板总 RNA, 1 μ l T17 AP 引物 (5'-gactcgagtcgacatcgattttttttttttt-3', 2.5 μ M), 8 μ l DEPC 水, 70 $^{\circ}$ C 保温 5min 后在冰上急冷 5min, 然后加入 4 μ l 5 $\times$ M-MLV (RNase H⁻) Buffer, 1 μ l RTase M-MLV (RNase H⁻) (200U/ μ l), 1 μ l dNTP 混合物 (各 10mM), 0.5 μ l RNase Inhibitor (40U/ μ l) 和 3.5 μ l DEPC 水, 在 42 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 所得即为 3' 端第一链 cDNA 原液。

1.2.3 3'-RACE

根据已知真菌 CDA 基因的保守区序列^[7], 设计总状毛霉 CDA 基因特异的兼并引物 GSP 1 (5'- gatgatgmcyaactgyc-3'), 对应的 mRNA 位置从 605bp 到 625bp。

采用 50μl 反应体系来扩增基因 cDNA 的 3'-末端: 2μl 上述 3' 端第一链 cDNA 原液, 5μl 10×PCR 缓冲液, 1μl *TaqE* (2.5U), 2μl dNTP, 1μl AP 引物 (5'- gactcgagtcgacatcg-3', 25μM), 1μl GSP1 引物 (25μM) 和 38μl 无菌水。PCR 程序: 95℃ 5min; 94℃ 45s, 57℃ 45s, 72℃ 90s, 35 个循环; 72℃ 延长 10min。

扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 割胶, 采用胶回收试剂盒纯化目的 PCR 产物, 回收 PCR 产物与 pMD19-T 载体进行连接, 转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布于含 IPTG 和 X-Gal 的 LB 固体培养基 (AMP^r) 上进行蓝白斑筛选, 白斑经 PCR 鉴定后得到阳性菌落, 甘油保存的菌液 (-20℃) 送往上海生工有限公司双向测序。

1.2.4 5'端第一链cDNA的合成及加poly (A) 尾

根据 3'-RACE 测得的总状毛霉 CDA 基因 3'端的序列信息, 设计相应的与 mRNA 互补引物 GSP2、GSP3。

GSP 2: 5'- cggtgttgtaagcgtagtc-3' (797-778 bp)

GSP 3: 5'- acagtgctccaaagtctcaga-3' (996-977 bp)

以 GSP 3 为引物, 进行 5'端第一链 cDNA 的合成, 试剂、方法与 3'端第一链 cDNA 的合成相同。然后, 在 5'端 RT 混合液中加入 RNase H, 分解 mRNA, 并用试剂盒回收第一链 cDNA (5'端), 去处多余的 dNTP、引物等。再用 *TdT* 加尾酶在回收的单链 cDNA 的 3'端加 poly (A), 用试剂盒回收加了 poly (A) 尾的单链 cDNA, 所得即为 5'端第一链 cDNA 原液。

1.2.5 5'-RACE

以 5'端第一链 cDNA 原液为模板, 用 GSP 2 和 T17 AP 为正反向引物, 进行第一次 PCR 反应, 30 个循环, 反应条件及 PCR 程序同上。用试剂盒回收 PCR 产物。再以此产物为模板, 用 GSP 2 和 AP 为引物, 进行第二次 PCR 反应, 35 个循环, 其它反应条件同上。第二次 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 割胶回收目的片段, 再进行连接、转化、克隆和测序。

1.2.6 序列分析

用 BioEdit 7.0 软件中的 CLUSTAL W^[8]程序比较 5'- / 3'-RACE 序列重叠部分, 去掉 5'- / 3'-RACE 序列两端添加的引物部分, 拼接得到全长 cDNA 序列。

采用 Blast n/p 软件在 GenBank 中对获得的全长 cDNA 及其推测的氨基酸序列进行同源搜索, 并用 CLUSTAL W 程序对搜索得到的 CDA 核苷酸和氨基酸序列进行多序列比对。用 MEGA 3.1 软件包中的最大似然法 (Maximum Parsimony) 重建系统树^[9], 并对其进行自展 (bootstrap, 1000-replicates) 检验。

2. 结果

2.1 总RNA的抽提结果

抽提对数生长期的总状毛霉总RNA, 变性琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示。图中显示抽提的总RNA完整性良好。

2.2 总状毛霉甲壳素脱乙酰酶全长cDNA的克隆

根据3'-RACE操作流程, 用AP引物和GSP1引物扩增得到一条DNA带, 大小约为900 bp (图

1)，扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离后，割胶回收目的PCR产物，与T载体连接、转化、克隆和双向测序。得到一个3'末端含Poly(A)的907bp序列。经GenBank Blast分析，确定为总状毛霉CDA基因的3'端序列。

利用3'-RACE得到的序列信息，设计与mRNA互补的引物GSP2和GSP3。根据5'-RACE操作流程，最后获得820 bp左右的特异性条带（图1），扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离后，割胶回收目的PCR产物，与T载体连接、转化、克隆和双向测序。得到5'末端含Poly(A)的一个823bp序列，去除5'末端的Poly(A)后，获得一个797bp序列。经GenBank Blast分析，确定为总状毛霉CDA基因的5'端序列。

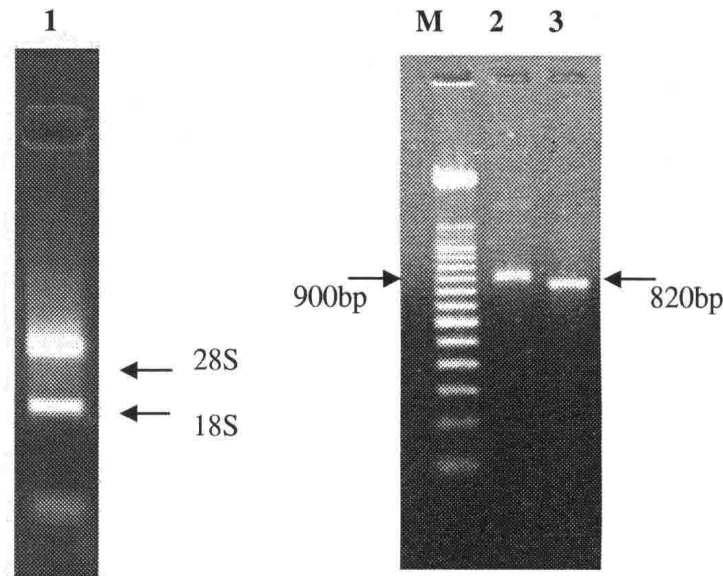


图1 总状毛霉的总RNA和RACE扩增产物的电泳结果
(1为总RNA；2为3'-RACE；3为5'-RACE；M为Marker)

Fig 1. Electrophoretic profiles of total RNA and RACE of chitin decacetylase gene in *Mucor racemosus*
(1: total RNA; 2: 3'-RACE; 3: 5'-RACE; M: Marker)

2.3 序列拼接与分析

根据3'-RACE和5'-RACE的结果，用CLUSTAL W程序比较5'- / 3'-RACE序列重叠部分，去掉5'- / 3'-RACE序列两端添加的引物部分，拼接得到全长cDNA序列（GenBank DQ538514）。序列分析显示，总状毛霉CDA基因全长为1506 bp，包括67 bp 5'非翻译区，1344 bp阅读框以及95bp 3'非翻译区，3'非翻译区包含Poly (A) 加尾信号AATAAA。通过NCBI提供的Blastn程序在GenBank中进行比对，发现该cDNA序列与甲壳素脱乙酰酶基因高度相关。

总状毛霉的CDA基因共编码448个氨基酸。通过生物信息学的方法进行推测氨基酸序列比对（Blastp），发现推测得到的总状毛霉CDA的中部包含一个144个氨基酸的多糖脱乙酰酶保守结构域，约占总状毛霉CDA全长的32%。该保守结构域不仅在许多真菌的CDA中均存在^[7]，甚至在一些细菌，如枯草芽孢杆菌的脱乙酰酶（GenBank AAC46306）也存在^[10,11]（图2）。

采用SWISS-MODEL程序（<http://swissmodel.expasy.org/>），通过同源模建预测该基因所编码的蛋白质的三维结构，进一步表明该蛋白质具有甲壳素脱乙酰酶完整的功能性结构，并包含一个保守的多糖脱乙酰酶结构域，两者具有非常相似的三级结构（图3）。

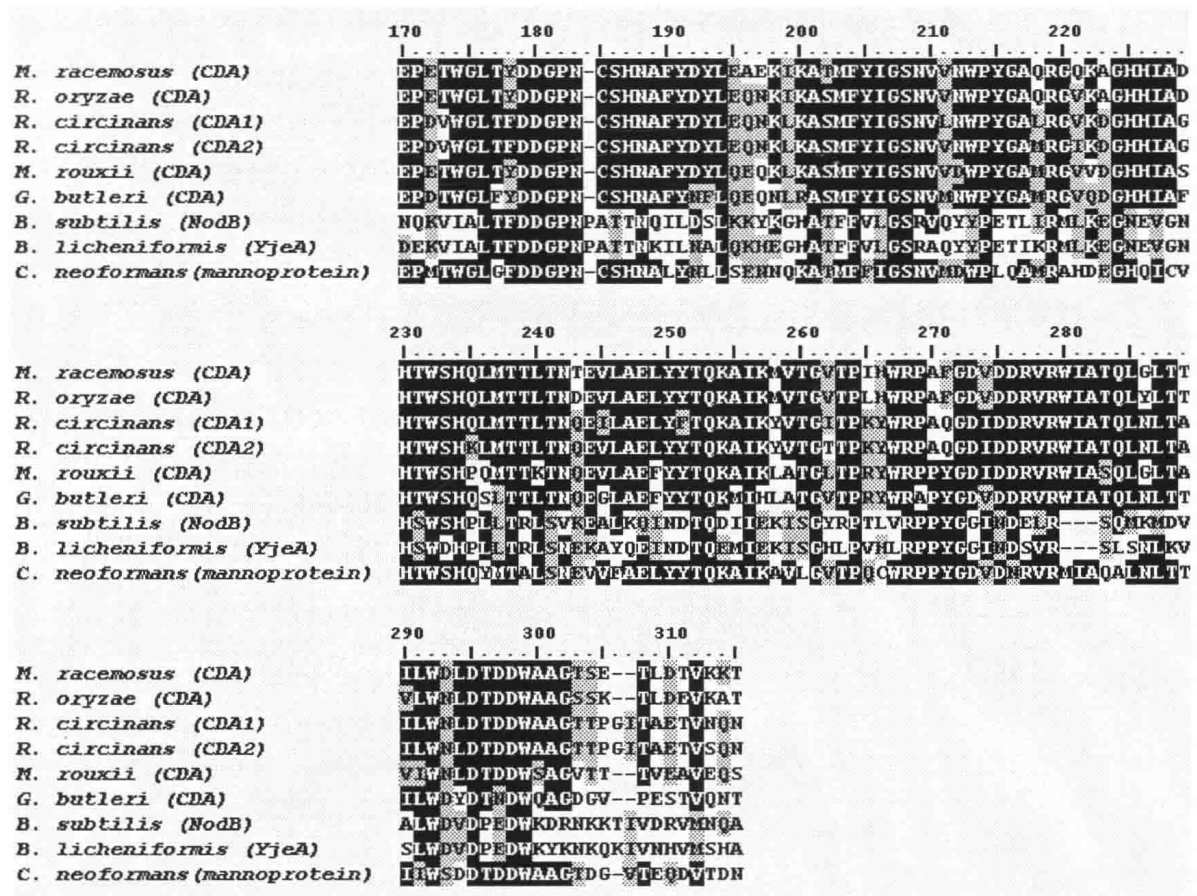


图 2 不同真菌 CDA 和细菌的脱乙酰酶均含有一个保守的多糖脱乙酰酶结构域

Fig 2. Conserved polysaccharide decacetylase domain in different decacetylases of bacteria and CDA of fungi

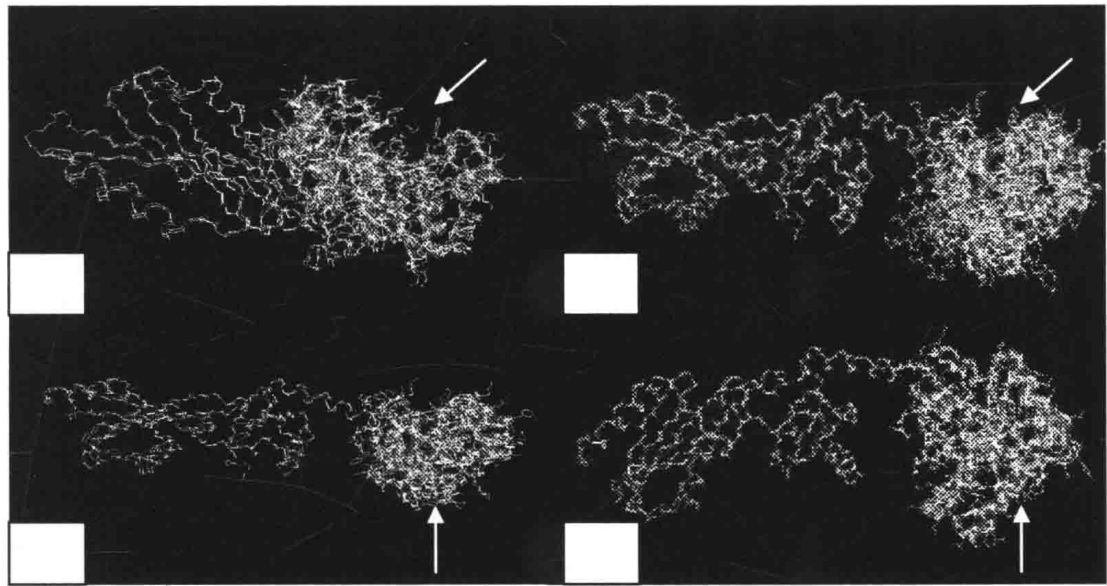


图 3 总状毛霉 CDA 基因推测蛋白质 (A)、多糖脱乙酰酶结构域 (B) 与鲁氏毛霉 (*M. rouxii*) 的 CDA (C)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的多糖脱乙酰酶 (D) 的三级结构比较

Fig 3. Tertiary structure comparison of deduced CDA from *M. racemosus*, conserved polysaccharide decacetylase domain with CDA from *M. rouxii*, polysaccharide decacetylase from *B. subtilis*

2.4 系统发生分析

总状毛霉甲壳素脱乙酰酶基因的cDNA序列与其它相近种米根霉 (*Rhizopus oryzae*)

(AY225513)、卷柄根霉(*Rhizopus circinans*)的CDA1 (AY861444)和CDA2 (AY861445)、鲁氏毛霉(*Mucor rouxii*) (Z19109)、卵形孢球托霉(*Gongronella butleri*) (AF411810)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*) (AY779045)、布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus*) (AB046690)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的CDA1 (AY557948)和CDA2 (AY557951)的基因序列同源性分别为: 75%、58%、56%、56%、48%、39%、39%、17%和16%; 相应的氨基酸序列的同源性分别为: 69%、57%、59%、55%、47%、30%、32%、18%、21%。

不同真菌的CDA基因的系统发生分析表明, 总状毛霉CDA基因与同科(毛霉科, *Mucoraceae*)的米根霉、卷柄根霉的CDA1和CDA2、鲁氏毛霉、卵形孢球托霉、匍枝根霉、布拉克须霉之间有较高的核苷酸和氨基酸序列同源性, 而与酿酒酵母CDA1和CDA2的氨基酸序列的同源性相对较低, 约为20%, 表明CDA基因在不同的真菌中有着不同的亲缘关系。

根据总状毛霉CDA基因的氨基酸序列, 构建的不同真菌的系统树, 与采用经典分类法构建的系统树基本一致(图4)。

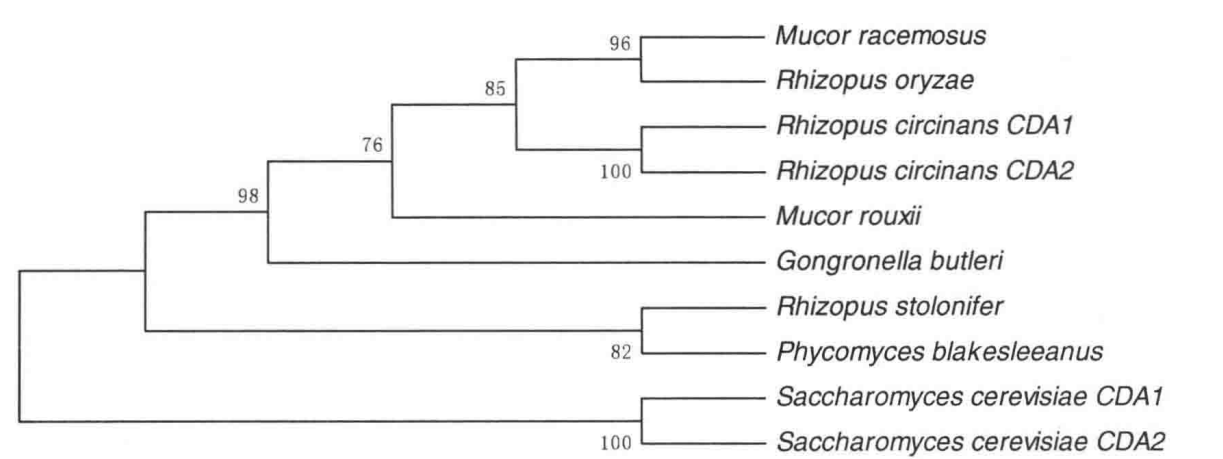


图 4 不同真菌甲壳素脱乙酰酶基因推测氨基酸序列的聚类分析

Fig 4. Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of chitin decacetylase from various fungi

(注: *Mucor racemosus*: 总状毛霉; *Rhizopus oryzae*: 米根霉; *Rhizopus circinans*: 卷柄根霉; *Mucor rouxii*: 鲁氏毛霉; *Gongronella butleri*: 卵形孢球托霉; *Rhizopus stolonifer*: 匍枝根霉; *Phycomyces blakesleeanus*: 布拉克须霉; *Saccharomyces cerevisiae*: 酿酒酵母)

3. 讨论

从 cDNA 文库中分离和克隆目的基因的经典方法繁琐而且代价大。并经常出现 PCR 扩增效率低和特异性差等问题, 不易得到完整的全长序列(包括 5'和 3'非翻译区), 特别是在基因的 5'端。RACE 技术的出现解决了这些难题, 它可以从低丰度的转录模板中快速扩增 cDNA 的 5'和 3'末端, 是一种简便而且有效的方法。然而, RACE 技术的应用也存在一些限制因素, 主要是合适引物的设计如基因特异引物(GSP1)、Nested PCR 引物(GSP2、GSP3)的设计等。由于总状毛霉 CDA 基因的 cDNA 目前尚未被克隆, 而该基因在不同真核微生物中的相似度差异较大, 与之最近的米根霉的基因相似度也不过 75%, 因此根据已知真菌 CDA 基因的保守区序列, 设计出合适的总状毛霉 CDA 基因特异的兼并引物 GSP1, 是总状毛霉 CDA 基因的 cDNA 克隆的关键。通过多次探索, 我们设计出兼并引物 GSP 1 (5'- gatgatggmccyaactgytc-3'), 对应

的基因位置从 605bp 到 625bp, 可适用于总状毛霉 CDA 基因 cDNA 的克隆。

目前在 20 余种真核微生物中已发现存在 CDA 基因, 其中研究最多的是模式生物酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。在酿酒酵母中已发现存在 2 个 CDA 基因 (CDA1 和 CDA2), 分别位于 8 号染色体的 745622 – 746527bp 和 747939 – 748877bp 位置, 两者相距仅 1.4Kb, 并且两者的功能是互补的, 共同参与细胞壁成分的生物合成、维持细胞的刚性结构^[12]。另外, 在卷柄根霉 (*Rhizopus circinans*) 中也发现了 CDA1 和 CDA2 的存在。本文所研究的总状毛霉中是否也存在另一 CDA 基因, 还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Matsuo Y, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M. *cdal*⁺, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS letters*, 2005, 579:2737~2743
- [2] Mishra C, Semino C, McCreath K.J, Vega H, Jones B, Specht C, Robbins P. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, 13:327-336
- [3] Shrestha B, Blodeau K, Stevens W, Hegarat F. Expression of chitin deacetylase from *colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 2004, 38:196-204
- [4] Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. Chitin deacetylase: New versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18: 305~312
- [5] Jiang X-Y(蒋霞云), Zhou P-G(周培根), Li Y(李燕), Wang X-H(王晓辉), Dang P-Y(党培育). Comparisons of activities of chitin deacetylase from mold strains and study of its properties. *Journal of Shanghai Fisheries University* <上海水产大学学报>, 2006, 15(2):211~215 (in Chinese with English abstract)
- [6] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Beijing: Science Press. 2002 (in Chinese)
- [7] Maw T, Tan T.K, Khor E, Wong S.M. Complete cDNA sequence of chitin deacetylase from *Gongronella butleri* and its phylogenetic analysis revealed clusters corresponding to taxonomic classification of fungi. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 2002, 93(4):376~381
- [8] Thompson J D. Higgins D G and Gibson T J. CLUSTALW : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Reviews*, 1994, 22: 4673-4680
- [9] Kumar S, Tamura K and Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5:150-163
- [10] Kafetzopoulos D, Thireos G, Vournakis J. Bouriotis V. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *PNAS*, 1993, 90 (17): 8005-8008
- [11] Ohishi K, Murase K, Ohta T, Etoh H. Cloning and sequencing of the deacetylase gene from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 2000, 90(5):561~563
- [12] Christodoulidou A, Bouriotis V, Thireos G. Two sporulation- specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(49):31420-31425

黄鳍鲷骨骼肌 α -辅肌动蛋白的分离纯化及抗体制备

杜雪莉^{1,2}, 梁银龙¹, 王锡昌², 苏文金¹, 曹敏杰¹

(1, 集美大学生物工程学院, 厦门, 361021;

2, 上海水产大学食品学院, 上海, 200090)

摘要: 目的: 黄鳍鲷骨骼肌 α -辅肌动蛋白的分离纯化及抗体制备。方法: 采用低温抽提、硫酸铵分级沉淀、离子交换层析等方法提取 α -辅肌动蛋白; 通过免疫大鼠获得抗 α -辅肌动蛋白抗体并通过Western blot检测抗体的特异性。结果: 经SDS-PAGE检测得到高度纯化的黄鳍鲷 α -辅肌动蛋白, 分子量约为100 kDa。Western blot检测结果显示, 制备的多克隆抗体具有较高的效价和良好的特异性。结论: 从海水黄鳍鲷骨骼肌中得到高度纯化的 α -辅肌蛋白, 并获得了滴度高, 特异性好的多克隆抗体, 为将来鱼类保鲜储藏过程中 α -辅肌动蛋白的分解变化情况分析及水产品保鲜加工基础理论研究提供重要的手段。

关键词: 黄鳍鲷; α -辅肌动蛋白; 纯化; 多克隆抗体

Purification and Polyclonal Antibody Preparation of α -actinin from Sea Bream (*Sparus latus*)

Du Xueli^{1,2}, Liang Yinlong¹, Wang Xichang², Su Wenjin¹, Cao Minjie^{1*}

(1, School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen, 361021; 2, College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai, 200090)

Abstract: Objective: To purify and prepare polyclonal antibody of α -actinin from sea bream (*Sparus latus*). Methods: α -actinin was extracted at low temperature, ammonium sulfate fractionation and purified by column chromatographies on DEAE-Sepharose. Polyclonal antibody was prepared by immunizing rats with purified α -actinin. The specificity of the antibody was analysed by Western blot. Results: The molecular weight of highly purified α -actinin as determined by SDS-PAGE was approximately 100 kDa. Western blot analysis revealed that the antibody holds higher titer and specificity in reaction with the purified α -actinin and α -actinin in myofibril. Conclusion: α -actinin was purified from the skeletal muscle of sea bream (*Sparus latus*) and polyclonal antibody was prepared.

Key words: *Sparus latus*; α -actinin; Purification; Polyclonal antibody

α -辅肌动蛋白为肌肉的调节蛋白, 是肌原纤维 Z 线的主要组成成分之一^[1~2], 其含量约占肌原纤维蛋白的 2%。 α -辅肌动蛋白形状为棒状^[3], 由两个相同的亚基构成, 分子量大小约为 100 kDa^[4]。在肌原纤维膜的 Z 区中, α -辅肌动蛋白的细丝与肌动蛋白的细丝连接^[5], 并且 α -辅肌动蛋白易与 F-肌动蛋白结合, 发生凝胶化反应^[6]。也有报道指出 α -辅肌动蛋白在 Z 区与肌联蛋白细丝的 N 端相连^[7], 同时在肌原纤维的 M 中线位置与肌联蛋白的 C 端相连接^[8~9]。因此, α -辅肌动蛋白在构成细胞肌原纤维结构及维持细胞结构的稳定性中起着重要作用。

目前, 国外对 α -辅肌动蛋白的研究较多, 已分别从鸡^[4,10]、兔^[11]、鲑鱼和鳕鱼^[12]等不同的动物以及动物体内不同的组织和器官如平滑肌^[4]、人脑^[14]、肾脏^[11]、肺^[15]、肌肉^[13]等进行了分

离纯化工作。而国内,有关 α -辅肌动蛋白的研究报道较少,仅有李晓楠等^[13]从人骨骼肌中分离纯化 α -辅肌动蛋白的报道,而对鱼类的研究还未见报道。

黄鳍鲷(*Sparus latus*), 属鲈形目(*Percoiformes*) 鲷科(*Sparidae*), 是一种名贵的海洋经济鱼类,也是我国海水鱼类养殖的重要对象。本文以海水黄鳍鲷为研究对象,旨在黄鳍鲷中提取并纯化 α -辅肌动蛋白。此外,利用纯化的 α -辅肌动蛋白制备特异性多克隆抗体。为进一步研究 α -辅肌动蛋白在鱼类保鲜贮藏过程中的分解变化情况提供研究基础。

1. 材料与方法

1.1 材料与试剂

体重 200 g 左右的鲜活养殖黄鳍鲷(*Sparus latus*)购自集美菜市场,即杀后取背部肌肉,立即使用或冻存于-70℃冰箱待用。20 日龄二级健康雄性 SD (Sprague - Dawley) 大鼠,购自厦门大学实验动物研究中心。

DEAE-Sepharose和Protein A Sepharose从Amersham Biosciences公司购得, SDS-PAGE用的标准蛋白样液从Fermentas公司购得。Western blot所用的标准蛋白样液从New England BioLab 公司购得。兔抗大鼠IgG-HRP从DAKO公司购得。其它试剂均为化学纯或分析纯。

1.2 主要仪器及设备

高速冷冻离心机(Beckman); 凝胶成像仪(Vilber Lourmat); 组织捣碎机(Kinematica); 紫外分光光度计 (Varian); 恒温水浴(Memmert); 蛋白电泳及电转移装置(Bio-Rad)等。

1.3 方法

1.3.1 α -辅肌动蛋白的提取与纯化

1.3.1.1 α -辅肌动蛋白的粗提取

以下整个过程在4℃条件下进行。新鲜的黄鳍鲷背肌(约100 g),加5倍体积的冰冷缓冲液A (0.25 M蔗糖、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、1 mM NaN₃、0.5 mM PMSF, pH 8.5) 用组织捣碎机捣碎4次(每次不超过15 s, 中间间隔1 min), 25,500×g 离心30 min, 弃上清, 重复2次。将沉淀悬浮于5倍体积的冰冷缓冲液B (50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、1 mM NaN₃、0.5 mM PMSF, pH 7.5), 快速组织捣碎1次, 25,500×g 离心30 min, 弃上清。再次将沉淀悬浮于5倍体积的冰冷缓冲液C (去离子水, 1 mM EDTA、1 mM NaN₃、0.5 mM PMSF, pH 7.0), 组织捣碎1次, 不超过15 s, 将悬浊液充分抽提40 min后, 25,500×g 离心1 h, 得上清, 将沉淀溶于5倍体积的缓冲液C抽提过夜, 次日, 25,500×g 离心30 min, 得上清, 将沉淀溶于5倍体积的缓冲液C抽提2 h, 离心, 得上清, 重复1次, 收集四次上清, 经四层绢布过滤后, 25,500×g离心2 h。取上清进行饱和硫酸铵16%~40%分级沉淀, 将沉淀用少量的冰冷缓冲液D (20 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、1 mM NaN₃、0.5 mM PMSF, pH 7.5)溶解, 在冰冷缓冲液D透析过夜。透析后样品 60,000×g 离心2.5 h, 得上清。

1.3.1.2 α -辅肌动粗蛋白的 DEAE-Sepharose 离子交换层析

所得上清上样DEAE-Sepharose Fast Flow (2.6×10 cm) 离子交换层析柱, 平衡缓冲液为缓冲液D, 流速 1.0 mL/min。洗脱时先用缓冲液D洗脱未结合上的蛋白质, 然后用含有 0~0.6 M NaCl

的缓冲液D 洗脱结合上的蛋白质, 洗脱体积为柱床体积的三倍, 流速 0.5 mL/min, 每管收集2 mL。测定蛋白质的 A_{280} 值, 以吸光度(A)为纵坐标, 管数为横坐标, 得到各蛋白质的洗脱曲线。收集含有 α -辅肌动蛋白的部分, 再次上样离子交换柱DEAE-Sepharose, 最后得到纯度较高的 α -辅肌动蛋白。

1.3.2 大鼠抗黄鳍鲷 α -辅肌动蛋白抗血清的制备

1.3.2.1 抗血清的制备

选用20日龄二级健康雄性SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 喂养几天后进行免疫。第一次免疫: 抗原0.5 mL (200 μ g/mL), 加入福氏完全佐剂0.5 mL, 超声乳化后, 进行大鼠皮下多点注射; 两周后第二次加强免疫: 抗原0.5 mL (200 μ g/mL), 加入福氏不完全佐剂0.5 mL, 超声乳化后, 进行大鼠皮下多点注射; 隔一周后加强免疫1次, 重复2次。抗原用量同第二次, 进行皮下肌肉多点注射。第四次免疫一周后, 对大鼠采血。

1.3.2.2 多克隆抗体的纯化

将上述中获得的大鼠抗 α -辅肌动蛋白抗血清经Protein A Sepharose亲和层析柱 (1 $\times$ 5 cm) 纯化。用纯化的 α -辅肌动蛋白抗体与肌原纤维蛋白反应, 利用Western blot印迹法来鉴定抗体的特异性。

1.3.3 SDS-PAGE 及 Western blot

SDS-PAGE 参照 Laemmli 法^[16]进行以考马氏亮蓝染色。Western blot 依照 Towbin 法^[17]进行以二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色。

2. 结果与讨论

2.1 α -辅肌动蛋白的粗提取结果

鱼体的肌肉大部分由骨骼肌构成, 其结构组成与鸡、兔等动物有一定区别。有关文献报道^[10]剧烈的组织捣碎易引起肌肉结构蛋白的破坏。因此, 在 α -辅肌动蛋白的粗提过程中, 与 Barbara 等^[10]从鸡胗中提取 α -辅肌动蛋白的方法不同, 采用缓冲液 A 和缓冲液 B 进行抽提时, 减少了离心的时间及次数。

硫酸铵饱和沉淀时, 与文献报道的 0~40% 硫酸铵沉淀^[12]和两次硫酸铵分级沉淀^[10]不同, 本实验采用的 16~40% 硫酸铵分级沉淀。进行 0~40% 一级硫酸铵饱和沉淀会含有较多的杂蛋白, 而 0~16% 的初级沉淀去除了一部分杂蛋白, 为进一步纯化 α -辅肌动蛋白提供了良好条件。此外两次硫酸铵分级沉淀法在 α -辅肌动蛋白得率上也没有明显的提高。采用 16~40% 硫酸铵分级沉淀获得了较好的效果。

2.2 初次DEAE-Sepharose离子交换层析结果

如图 1 所示, 经硫酸铵沉淀得到的沉淀物溶解透析后, 上样于 DEAE-Sepharose 离子交换柱, 蛋白经洗脱后, 共出现三个蛋白峰。经 SDS-PAGE 检测, 其中, 峰 a 主要是 α -辅肌动蛋白, 峰 b 和 c 为杂蛋白峰。离子交换层析得到的蛋白峰分布与李晓楠等^[13]从人骨骼肌中分离纯化 α -辅肌动蛋白的结果有所不同, 这可能与蛋白的来源及前处理方法不同有关。

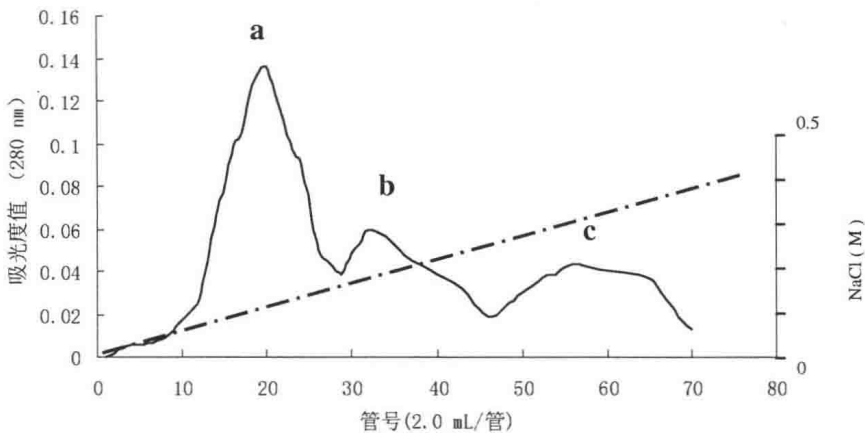


图 1 α -辅肌动蛋白初次上样 DEAE-Sepharose 的结果
Fig.1 First DEAE-Sepharose column chromatography of α -actinin

2.3 峰a的SDS-PAGE结果

图 2 为峰 a 的 SDS-PAGE 结果，由图可知，峰 a 中主要成分为 α -辅肌动蛋白。

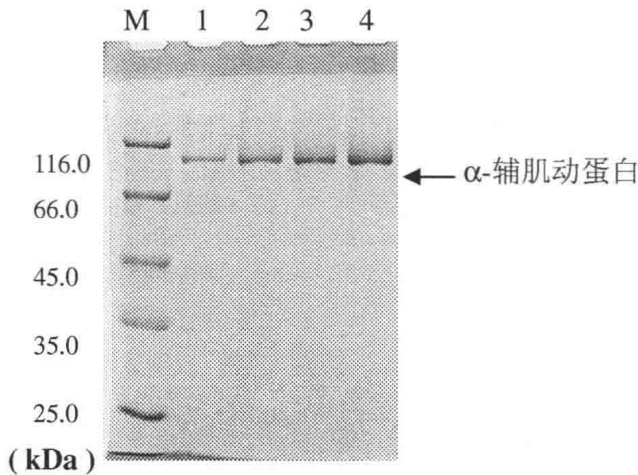


图 2 α -辅肌动蛋白初次上样 DEAE-Sepharose 的 SDS-PAGE
Fig.2 SDS-PAGE of first DEAE-Sepharose column purified α -actinin
M, 标准蛋白; 1, 13 管; 2, 14 管; 3, 15 管; 4, 17 管

2.4 二次DEAE-Sepharose离子交换层析结果

收集含有 α -辅肌动蛋白的洗脱液，再次上样 DEAE-Sepharose，得到的洗脱曲线吸收峰如图 3 所示。峰 a 中含有纯度较高的 α -辅肌动蛋白，峰 b 和 c 为杂蛋白峰。

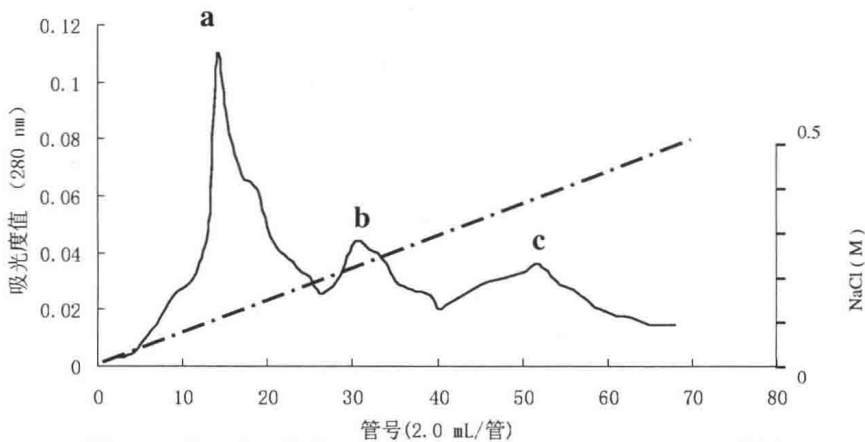


图 3 α -辅肌动蛋白第二次 DEAE-Sepharose 离子交换层析结果
Fig.3 Second DEAE-Sepharose column chromatography purification of α -actinin

2.5 α -辅肌动蛋白的纯化结果

通过上述处理，我们获得了高度纯化的黄鳍鲷 α -辅肌动蛋白（图 4）。纯化蛋白的分子量约为 100 kDa。此结果与来自鸡^[4, 10]、鲈鱼和鳕鱼^[12]等的 α -辅肌动蛋白相似。纯化的 α -辅肌动蛋白主要为单一条带，但有轻微的降解，可能的原因是纯化过程中透析时间较长而引起。

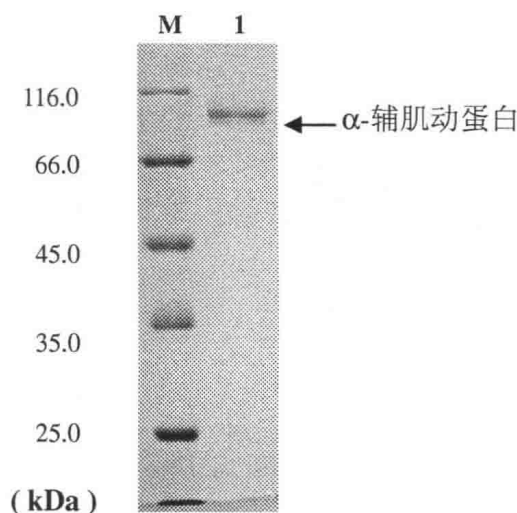


图 4 纯化 α -辅肌动蛋白的 SDS-PAGE
Fig.4 SDS-PAGE of purified α -actinin
M, 标准蛋白; 1, 纯化的 α -辅肌动蛋白

2.6 大鼠抗 α -辅肌动蛋白血清的鉴定

用纯化的 α -辅肌动蛋白免疫大鼠，获得大鼠抗血清，免疫印迹法检测效价为 1:3200。以抗 α -辅肌动蛋白的大鼠血清作为一抗，通过 Western blot 印迹方法检测，结果显示，纯化蛋白（泳道 1-5）与肌原纤维蛋白（泳道 6）均在相对分子量约 100 kDa 处出现了特异的蛋白条带（图 5）。说明所制备的 α -辅肌动蛋白抗体特异性良好。

有文献报道，动物体死后 α -辅肌动蛋白的降解变化明显，并指出肌肉软化的原因与 α -辅肌动蛋白的降解有一定的关系^[18~20]。但由于 α -辅肌动蛋白在肌原纤维中所占的比例很少，此外，该蛋白的降解情况则由于肌球蛋白重链等大分子降解产物的影响难于通过 SDS-PAGE 作判断。通过制备多克隆抗体进行 Western blot 免疫印迹法检测即可较好的判断其变化情况。本研究制备的多克隆抗体滴度高，特异性好，为将来鱼类保鲜贮藏过程中 α -辅肌动蛋白的分解变化情况分析 & 水产品保鲜加工基础理论研究提供了重要的手段。

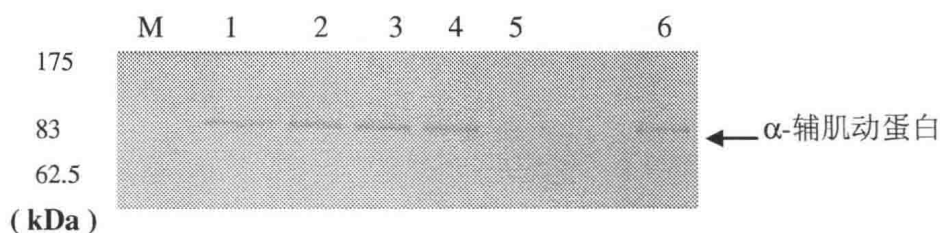


图 5 免疫印迹法检测多克隆抗体特异性
Fig.5 Polyclonal antibody specificity checking by Western blot
M, 标准蛋白; 1-5, 纯化的 α -辅肌动蛋白; 6, 肌原纤维蛋白