# 克氏原螯虾虾青蛋白 A2 基因克隆、组织分布及原核表达

陈 浩[1,2,3,4,5]，吉宏武[*1,2,3,4,5]，张 迪[1,2,3,4,5]，刘书成[1,2,3,4,5]，宋文奎[1,2,3,4,5]，郝记明[1,2,3,4,5]

（1. 广东海洋大学 食品科技学院，广东 湛江 524008；2. 广东省水产品加工与安全重点实验室，广东 湛江 524008；3. 广东省海洋生物制品工程实验室，广东 湛江 524008；4. 广东省海洋食品工程技术研究中心，广东 湛江 524008；5. 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室，广东 湛江 524008）

**摘要：**虾青蛋白对甲壳类水产品色泽的形成和调控具有重要作用。为探究克氏原螯虾虾青蛋白 A2（PcCRA2）的基因结构及原核表达，作者通过基因克隆获得 PcCRA2 基因编码序列（*cra2*），采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测 *cra2* 基因在克氏原螯虾 9 种组织中的表达模式，并以大肠杆菌 BL21（DE3）为宿主，进行 PcCRA2 异源重组表达。结果表明，克氏原螯虾 *cra2* 基因 cDNA 全长 573 bp，编码 190 个氨基酸。生物信息学分析显示，虾青蛋白 A2 相对分子质量为 21 158.9，理论等电点为 5.59。氨基酸序列比对发现，克氏原螯虾 *cra2* 编码蛋白质序列与红螯螯虾相似度最高，为 91.58%。RT-qPCR 结果显示，*cra2* 在所检组织中均有表达，在表皮的表达量最高（$P<0.05$）。构建了 pET28a-*cra2* 原核表达载体，并在大肠杆菌 BL21（DE3）诱导表达。其最佳诱导表达条件为：接种 4 h 后加入 0.5 mmol/L IPTG 于 30 ℃诱导 6 h；UV-vis 结果表明重组蛋白质能与虾青素特异性结合，最大吸收峰为 505 nm。该研究结果为进一步研究虾青蛋白质的生物功能奠定基础。

**关键词：**虾青蛋白；克氏原螯虾；实时荧光定量 PCR；原核表达

**中图分类号：**S 98　**文章编号：**1673-1689（2024）02-0063-10　**DOI：**10.12441/spyswjs.20211013001

# Molecular Cloning, Tissue Distribution and Prokaryotic Expression of Crustacyanin A2 Gene from *Procambarus clarkii*

*CHEN Hao*[1,2,3,4,5]，*JI Hongwu*[*1,2,3,4,5]，*ZHANG Di*[1,2,3,4,5]，*LIU Shucheng*[1,2,3,4,5]，*SONG Wenkui*[1,2,3,4,5]，*HAO Jiming*[1,2,3,4,5]

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524008, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang 524008, China; 3. Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Zhanjiang 524008, China; 4. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Seafood, Zhanjiang 524008, China; 5. Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution Zhanjiang 524008, China)

**收稿日期：**2021-10-13　**修回日期：**2021-10-27

**基金项目：**国家现代农业产业技术体系资助项目（CARs-48）；广东海洋食品绿色加工技术团队项目（2019KCXTD011）。

* **通信作者：**吉宏武（1962—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事水产品精深加工与保鲜技术研究。E-mail：jihw62318@163.com

**Abstract**: Crustacyanin plays an important role in the formation and regulation of the color in crustacean aquatic products. To study the gene structural feature and prokaryotic expression of *Procambarus clarkii* (*P. clarkii*) crustacyanin A2 (PcCRA2), the coding sequence of PcCRA2 gene (*cra2*) was obtained by gene cloning. The expression patterns of *cra2* in 9 different tissues of *P. clarkii* were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). *Escherichia coli* BL21 (DE3) was used as the host to conduct the heterologous recombinant expression of PcCRA2. The results showed that the full length of *cra2* cDNA was 573 bp, encoding 190 amino acids. Bioinformatics analysis indicated that the relative molecular weight of PcCRA2 was 21 158.9, with a theoretical isoelectric point of 5.59. Amino acid alignment revealed that the protein coding sequence of *cra2* had the highest similarity to that of *C. quadricarinatus* (91.58%). RT-qPCR demonstrated that *cra2* was expressed in all tested tissues, with the highest expression in epidermis ($P<0.05$). The prokaryotic expression vector pET28a-*cra2* was constructed and induced in DE3. The optimal expression condition was adding 0.5 mmol/L IPTG at 30 ℃ for 6 h after 4 h of inoculation. Results indicated that the recombinant protein could specifically bind to astaxanthin, with a maximum absorption peak at 505 nm. These results provide a foundation for further studies on the biological function of crustacyanin.

**Keywords:** crustacyanin, *Procambarus clarkii*, real-time fluorescence quantitative PCR, prokaryotic expression

虾青蛋白(crustacyanin,CR)是甲壳动物中特有的一种载脂蛋白,属于脂钙蛋白(lipocalin)家族,常与虾青素特异性结合,从而为甲壳等组织提供颜色。Wade 等人研究发现,当提高饲料中类胡萝卜素的水平并养殖于黑色底质,斑节对虾(*Penaeus monodon*)表皮中的虾青蛋白含量显著增加,体色随之变得更蓝更黑[1]。而 Budd 等人采用 RNA 干扰技术沉默虾青蛋白基因,斑节对虾体色由蓝色转变为红色[2];显微结果显示,实验虾表皮上只有红色的虾青素颗粒,却未见有蓝色的蛋白质颗粒。Gao 等人采用类似方法干扰脊尾白虾虾青蛋白的表达,其体色也发生了较大的改变[3]。由此可见,虾青蛋白在提供甲壳水产品体表颜色以及参与色泽调控等方面发挥着重要作用。

虾青蛋白存在多种类型的亚基,依据相对分子质量、氨基酸组成和序列等性质的不同,主要分为 CR-A 亚型(包含 A2 和 A3)和 CR-C 亚型(包含 A1、C1 和 C2)。目前,从不同甲壳动物体表结构中纯化的天然虾青蛋白,均是由 CR-A 或 CR-C 亚型的一种或多种组合而成的多聚体,呈现蓝色、黄色等多种颜色,如来自欧洲龙虾(*Homarus gammarus*)甲壳的 $\beta$-虾青蛋白呈现紫色,由 A1 和 A3 亚基组成[4]。近年来,天然虾青蛋白多聚体的呈色机制越来越受到学者的关注,研究者运用晶体学、量子力学等方法对天然虾青蛋白多聚体结构进行了剖析,陆续提出了极化作用、共平面效应、激子耦合、烯醇化等理论[5-8]。但是,虾青素与虾青蛋白亚基之间相互作用引起复合物光谱红移的机制仍无定论。为此,Chayen 等将虾青蛋白多聚体脱去虾青素,纯化后得到单一的亚基并研究该亚基与虾青素的相互作用,取得了较好的效果[9]。但是该方法纯化难度较大,耗时费力。因此,快速简便制备虾青蛋白亚基能够为虾青蛋白呈色机制研究奠定良好基础。作为一种成熟的表达系统,大肠杆菌早已广泛应用于藻蓝蛋白等其他色素结合蛋白质的研究中[10-11]。大肠杆菌表达系统制备重组蛋白质,具有操作简便、经济快捷、纯度较高等优点。然而,虾青蛋白亚基异源重组表达的报道很少,关于克氏原螯虾虾青蛋白亚基的表达至今未有人研究。因此,以大肠杆菌为表达宿主,研究克氏原螯虾虾青蛋白亚基异源重组表达具有重要意义。

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),属甲壳纲、十足目、螯虾科,原产于北美洲,现已广泛养殖于长江中下游水域。近年来,因其色泽红亮、味道鲜美而

广受消费者的追捧。2020 年总产量已达 240 万 t，约占我国甲壳类水产品总养殖产量的 56.2%[12]。目前，克氏原螯虾相关研究多集中在养殖模式、食品安全监测、病毒与免疫等方面，而色泽与虾青蛋白相关研究较少[13-15]。作者所在课题组前期从克氏原螯虾甲壳中纯化得到一个蓝色的虾青素蛋白多聚体，亚基相对分子质量为 21 000（命名为 PcCRA2），经质谱鉴定以及氨基酸比对分析推测该亚基属于虾青蛋白家族。迄今，关于 PcCRA2 编码基因、组织分布以及异源表达还未有研究报道。作者通过基因克隆获得 PcCRA2 基因（命名为 *cra2*）的 DNA 和 cDNA 序列，采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）分析 *cra2* 基因在不同组织的表达特征，构建原核表达载体并在大肠杆菌中进行重组表达，为进一步研究虾青蛋白呈色机制及虾类色泽调控奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样品

克氏原螯虾：购自潜江市楚淼水产品有限公司，平均体长（11±1）cm，平均体质量（32±4）g，实验前暂养 1 d。随机挑取 6 只健康的克氏原螯虾进行解剖，分别取表皮、肌肉、心脏、血淋巴、胃、肝胰腺、肠道、神经、眼柄等 9 种组织用液氮速冻后，置于 -80 ℃保存待用。

### 1.2 菌种和质粒

大肠杆菌表达菌株 BL21（DE3）、大肠杆菌感受态 Top10、质粒 pET28a（+）、pMD19-T 载体：安徽通用生物系统有限公司。

### 1.3 主要试剂

Ezup 柱式 DNA 抽提试剂盒、柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒、T-载体 PCR 产物克隆试剂盒：上海生工生物工程有限公司；HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；LB 肉汤、LB 琼脂：北京陆桥技术股份有限公司；镍-次氮基三乙酸（Ni-NTA）琼脂糖凝胶：德国 Qiagen 公司；限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nco* I、T4 DNA 连接酶：宝日医生物技术（北京）有限公司；SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、蛋白质相对分子质量标准：上海碧云天生物技术有限公司；虾青素（ATX）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；卡那霉素（Kan）、异丙基-*β*-*D*-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）、曲拉通（Triton X-100）、尿素（Urea）、咪唑：北京索莱宝科技有限公司。

### 1.4 主要仪器

GeneAmp 9700 基因扩增仪：美国 Applied Biosystems 公司；CFX96 实时荧光定量 PCR 仪、GelDoc XR+凝胶成像系统：美国 Bio-Rad 公司；Cary 60 紫外可见分光光度计：美国 Agilent 公司；JY92-2D 超声波细胞粉碎机：宁波新芝生物科技股份有限公司；SW-CJ-2FD 超净工作台：苏州净化设备有限公司；HZQ-X100 全温振荡培养箱：苏州市培英实验设备有限公司。

### 1.5 克氏原螯虾 *cra2* 基因克隆

使用 Ezup 柱式 DNA 抽提试剂盒提取克氏原螯虾肌肉的基因组总 DNA。根据美国国家生物信息中心数据库（NCBI）公布的红螯螯虾虾青蛋白 A（GenBank：ALC79588.1）和凡纳滨对虾虾青蛋白 A2（GenBank：XP_027238673.1）高度保守氨基酸序列 MFTT（L/V）（V/I）AA 和 TAECVYRA，设计一对简并引物 A2-Fw 和 A2-Rev 用于 PCR 扩增，见表 1。以克氏原螯虾基因组总 DNA 为模板进行 PCR 扩增，然后将 PCR 扩增产物纯化回收后与克隆载体 pMD19-T 进行连接反应，得到的反应产物转化至大肠杆菌 Top10。通过菌液 PCR 验证获得阳性转化子，提取阳性转化子质粒进行酶切和测序验证，最终获得 *cra2* 基因的 DNA 序列。

根据已获得的 *cra2* 基因 DNA 序列设计一对引物 CA2-Fw 和 CA2-Rev 用于 *cra2* 基因 cDNA 克隆。使用柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取克氏原螯虾肌肉总 RNA，通过 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录，以反转录的产物为模板，以引物 CA2-Fw 和 CA2-Rev 进行 PCR 扩增。扩增产物的回收、连接以及筛选验证均和 *cra2* 基因 DNA 序列实验过程一致，最终获得 *cra2* 基因 cDNA 序列。

### 1.6 基因序列分析

用软件 DNAMAN 6.0 查找开放阅读框（ORF），并推导出氨基酸序列。通过 NCBI BLASTp 进行同源比对，并下载其他虾种虾青蛋白的氨基酸序列，用 DNAMAN 6.0 进行氨基酸序列多重对比，并用 MEGA 6.0 构建系统进化树。用 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白质理化性质；用

表 1 实验中所用引物序列

**Table 1 Primers used in experiments**

| 引物名 | 引物序列(5′–3′) | 用途 |
|---|---|---|
| A2–Fw | ATGTTTAC(C/A)ACA(C/G)TC(G/A)T(C/T)GCTGCT | 基因克隆 |
| A2–Rev | TTAAGCTCTGTAGAC(G/A)CA(CT)TC(A/G)GCCG | 基因克隆 |
| CA2–Fw | ATGTTTACCACTCTAATCGCT | 基因克隆 |
| CA2–Rev | TTAAGCTCTGTAGACGCACTC | 基因克隆 |
| ACT–F | GGTCCCCGTCTATGAAGGTT | 定量 PCR |
| ACT–R | TCAGCGGTGGTGGTGAAG | 定量 PCR |
| CRA–F | TCATTGATGCTCCTTCAGTGTT | 定量 PCR |
| CRA–R | GACTTGTAGTTGTCGGTGGTGA | 定量 PCR |

SignalP 4.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP–4.0/)分析信号肽;用 Tmpred program(https://www.expasy.org/resources/tmpred) 分析跨膜区;用 ScanProsite(http://prosite.expasy.org/)搜索蛋白质功能结构域;用 CDD Search(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/)进行保守结构域预测。

### 1.7 克氏原螯虾不同组织 *cra2* 基因表达分析

按照柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒分别提取克氏原螯虾 9 种组织的总 RNA,采用 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量和完整性。分别以 9 种组织总 RNA 为模板, 使用 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链,–20 ℃保存。根据已获得的 *cra2* 基因 cDNA 序列设计引物 CRA–F 和 CRA–R,同时以克氏原螯虾 $\beta$–actin 基因序列(GenBank:D14612.1)为内参设计引物 ACT–F 和 ACT–R。以获得的 cDNA 为模板,通过 RT–qPCR 测定 *cra2* 基因在 9 种组织中的表达情况。RT–qPCR 反应体系 10 μL:cDNA 2 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,2×AceQ qPCR SYBR Green Mix 5 μL,dd$H_2O$ 2 μL。扩增程序:95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 35 s, 进行 40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,95 ℃ 30 s,95 ℃ 15 s。每个样品重复 3 次。根据荧光定量数据,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组织中 *cra2* 基因的相对表达量, 结果表示为平均值±标准差。采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较分析,$P<0.05$ 表示差异显著。

### 1.8 PcCRA2 原核重组表达

**1.8.1** *表达载体的构建与转化* 用在线软件 JAVA Condon Adaption Tool(https://www.jcat.de/)将克氏原螯虾 *cra2* 基因 cDNA 序列按照大肠杆菌密码子偏好性进行优化。优化后的基因序列由安徽通用生物系统有限公司合成,合成过程中额外添加了限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nco* I 的酶切位点和 6×His 标签。合成好的基因和 pET28a 载体分别用 *Xho* I 和 *Nco* I 进行双酶切,并将酶切产物分别纯化回收后进行连接反应。将连接产物转化至大肠杆菌 Top10,经菌液 PCR 鉴定后,选取阳性克隆单菌落质粒进行双酶切和测序验证。最后将验证正确的质粒转化至表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)中。

**1.8.2** *重组 PcCRA2 诱导表达条件优化* 将构建成功的重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) 划线于含 Kan (100 mg/L)的 LB 固体平板上,挑取单菌落,接种于 4 mL 含 Kan(100 mg/L)的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养 12 h($OD_{600}$ 约为 1.0),然后按体积比 1:100 接种于 4 mL 含 Kan(100 mg/L)的 LB 液体培养基中。

1)最佳 IPTG 诱导终浓度的确定 接种后培养 3 h, 加入 IPTG 并使其终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L,37 ℃、200 r/min 振荡诱导 4 h。

2)最佳诱导起始点的确定 分别向接种后培养 2、3、4、5、6 h 的菌液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37 ℃、200 r/min 振荡诱导 4 h。

3)最佳诱导温度的确定。向接种后培养 4 h 的菌液加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,分别在 16、23、30、37、44 ℃的条件下 200 r/min 振荡诱导 4 h。

4)最佳诱导时长的确定 向接种后培养 4 h 的菌液加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,30 ℃、200 r/min 下分别诱导 2、4、6、8、10 h。分别取出1 mL 菌液,经 4 ℃、5 000 *g* 离心 3 min,收集菌体,超声(300 W 超声 10 s,间隔 15 s,共 30 次)处理后,进行 SDS–PAGE 电泳分析,并使用设备自带软件分析电泳条带灰度来确定目标蛋白质表达量。

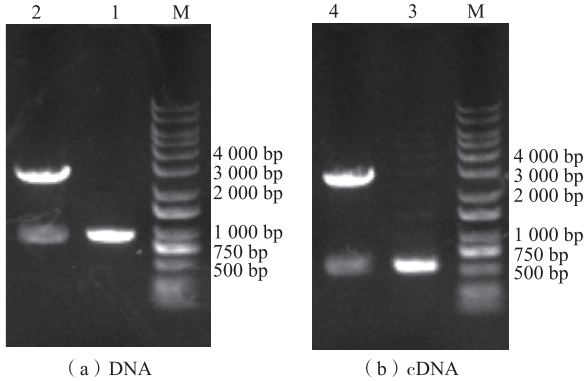
**1.8.3 重组蛋白的分离与纯化** 按最优条件扩大至 1 L 培养。所得菌体按 1 g:50 mL 用包涵体洗涤液（2 mol/L Urea，体积分数 1% 的 Triton X-100，50 mmol/L 的 pH 7.4 PBS）洗涤 2 次，4 ℃、5 000 *g* 离心 3 min。所得沉淀按 1 g:10 mL 加入变性液（8 mol/L Urea，50 mmol/L 的 pH 7.4 的 PBS）于 4 ℃搅拌溶解。按说明书使用 Ni-NTA 柱进行亲和层析纯化，8 mol/L 尿素—不同浓度咪唑（10、20、50、100、200 mmol/L）溶液由低至高进行梯度洗脱，分别收集洗脱液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。收集符合要求的洗脱液，使用尿素梯度（6、4、2、0 mol/L）透析复性，超滤浓缩，得到重组 PcCRA2。

**1.8.4 重组 PcCRA2 与虾青素特异性结合** 参照 PAN 等[16]的方法，稍作调整。将 40 mmol/L Tris-HCl（pH 7.0）、0.2 mol/L 硫酸铵溶液和 12 mmol/L 虾青素丙酮溶液等体积混合，加入重组 PcCRA2 并使其终浓度为 5 mmol/L，混合均匀，装入透析袋置于 20 mmol/L PBS 溶液中，4 ℃过夜。超滤除去游离虾青素后，测定其在 220~800 nm 的紫外可见光谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 *cra2* 基因的克隆及序列分析

DNA 和 cDNA 扩增结果见图 1。电泳检测分别在 750~1 000 bp 和 500~750 bp 处有单一条带。通过测序分别获得 *cra2* 基因 DNA 序列和 cDNA 序列。将 *cra2* 基因 DNA 序列和 cDNA 序列分别提交至 NCBI 数据库，序列登录号分别为 MW727506 和 MW727507。




（a）DNA （b）cDNA

M. DNA marker；1. DNA克隆；2. DNA片段连接T载体的酶切验证；3. cDNA克隆；4. cDNA片段连接T载体的酶切验证。

**图 1 克氏原螯虾 *cra2* 基因的扩增图谱**

**Fig. 1 Amplification of the *cra2* gene from *P. clarkii***

*cra2* 基因 cDNA 序列全长为 573 bp，共编码 190 个氨基酸，见图 2。由 ProtParam 预测分析可知，PcCRA2 蛋白分子式为 $C_{960}H_{1433}N_{237}O_{286}S_9$，相对分子质量为 21 158.9，理论等电点为 5.59，属酸性蛋白质。不稳定系数 39.29，推测该蛋白质为稳定蛋白质。脂肪系数为 66.74，平均亲水性系数-0.162，说明该蛋白质为亲水蛋白质。SignalP4.0 和 SMART 分析显示，PcCRA2 蛋白为分泌蛋白，信号肽序列为 1~16 氨基酸，ARM 保守结构域（lipocalin）为 43~184。通过 Tmpred蛋白质跨膜区分析发现，PcCRA2 蛋白存在 2 个由内向外的跨膜区（第 1~19、102~122 氨基酸位）和 1 个由外向内的跨膜区（第 1~19 氨基酸位）。ScanProsite 分析结果显示，PcCRA2 蛋白存在 1 个肌钙蛋白标记（lipocalin signature），位于 36~49 氨基酸处。

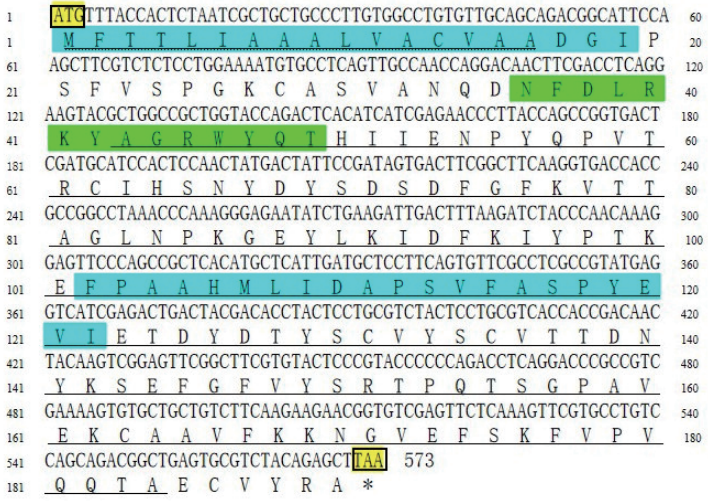
### 2.2 氨基酸同源性比较及系统发育分析

BLAST 比对结果表明，克氏原螯虾 PcCRA2 与 NCBI 公布的其他 100 种虾类虾青蛋白氨基酸序列的相似性在 57.89%~91.58%。其中，与红螯螯虾虾青蛋白 A（*Cherax quadricarinatus*，ALC79588.1）的相似度最高，达 91.58%；与欧洲龙虾虾青蛋白 A2（*H. gammarus*，P80007.1）、美洲龙虾虾青蛋白 A2（*Homarus americanus*，XP_042227234.1）和天鹅龙虾（*Panulirus cygnus*，ACL37112.1）相似度分别达到 87.93%、87.37% 和 73.68%。多重比较氨基酸序列发现，克氏原螯虾与其他 9 种虾的虾青蛋白均具有脂钙蛋白（lipocalin）家族典型区域 SCR-1（G-X-W，X 代表不同的氨基酸）、SCR-2（T-D-Y）和 SCR-3（R），而且这些区域在不同物种间具有高度保守性，见图 3。

利用 MEGA5.0 软件进行系统进化分析，结果显示，克氏原螯虾与红螯螯虾先聚在一起，再与欧洲龙虾、美洲龙虾、天鹅龙虾聚为一大支，而同属对虾科的日本对虾、凡纳滨对虾、宽沟对虾、刀额新对虾、斑节对虾聚为另一大支，见图 4。此外，遗传距离分析结果表明，克氏原螯虾与红螯螯虾具有最近的亲缘关系。

### 2.3 *cra2* 基因组织表达分布

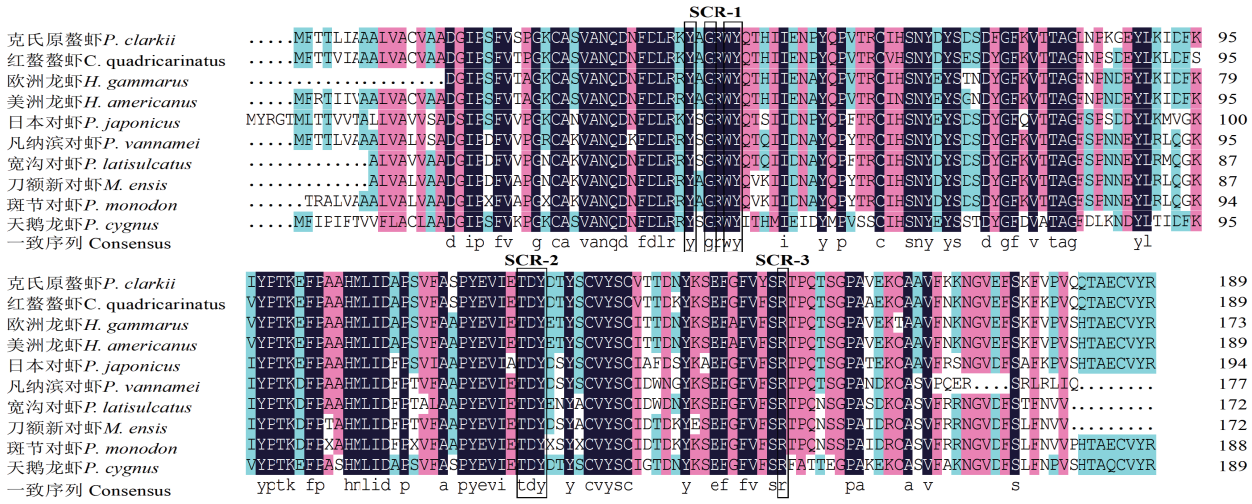
运用 RT-qPCR 检测 *cra2* 在克氏原螯虾 9 种组织中的表达水平见图 5。*cra2* mRNA 在各组织中均有表达，其中在表皮中的相对表达量显著高于其他组织（$P<0.05$），其次是肠道、肝胰腺，而肌肉中的表达量最低。



推导氨基酸序列位于 cDNA 序列下方;起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用黄色方框标注;信号肽用波浪线标注;ARM 结构域用下划线标注;跨膜域用蓝色阴影标注;肌钙蛋白标记用绿色阴影标注。

**图 2　克氏原螯虾 *cra2* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列**

**Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acids sequences of *cra2* gene from *P. clarkii***




小写字母、蓝黑色:一致氨基酸;粉色:相似性≥75%的氨基酸;蓝色:相似性≥50%的氨基酸。

**图 3　不同虾种虾青蛋白的氨基酸序列比对**

**Fig. 3　Multiple alignment of amino acid sequence of crustacyanin from various shrimp species**

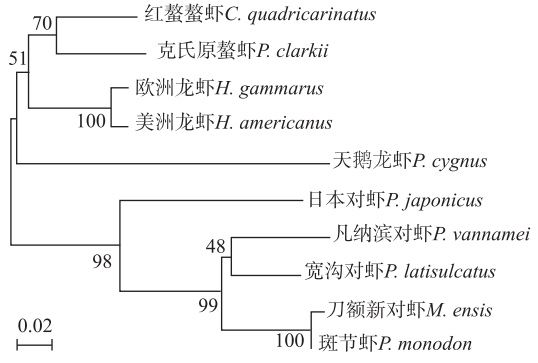
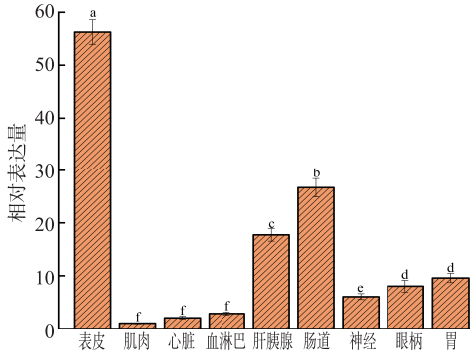



**图 4　虾青蛋白系统进化树**

**Fig. 4　Phylogenetic tree of crustacyanin**

## 2.4　PcCRA2 原核重组表达

**2.4.1**　*原核表达载体的构建与转化*　根据大肠杆菌密码子偏好性，优化了克氏原螯虾 *cra2* 基因 cDNA 序列。GC 比例由优化前的 54%减少至 46%，密码子适应指数(codon adaptation index)由 0.69 提高至 0.94,与理想值 1.0 更为接近,有利于目标基因高效表达[17]。经双酶切和测序验证,表达载体 pET28a-*cra2* 未发现移码、碱基突变等情况,与预期目标基因一致,表明 *cra2* 基因 cDNA 序列成功插入表达载体 pET28a 中。




不同字母者表示组间差异显著($P$<0.05)。

**图 5 克氏原螯虾 *cra2* 基因 mRNA 在不同组织中表达水平**

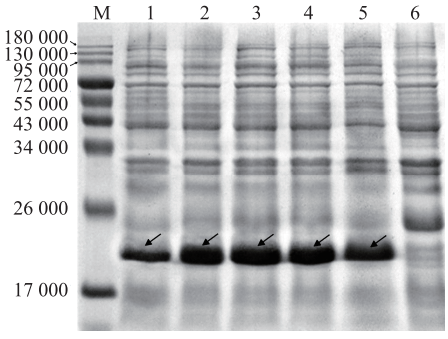
**Fig. 5 Expression level of *cra2*mRNA in different tissues of *P. clarkii***

**2.4.2 重组蛋白诱导表达条件的优化** 如图 6(a)所示,除了对照组(未诱导),不同终浓度的 IPTG 诱导下目标蛋白质均有表达(22 000),但表达量不同。当 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L 时,目标蛋白质表达量为 18.9%;IPTG 继续增加浓度至 0.5、1.0 mmol/L,目标表达量均明显增加,但是相差不大;当 IPTG 浓度增至 1.5、2.0 mmol/L 时,目标蛋白质表达反而减少。综合考虑目标蛋白质表达量和成本,选择 0.5 mmol/L 为最佳 IPTG 诱导终浓度。

如图 6(b)所示,接种后 4 h 时开始诱导,目标蛋白质表达量最高,约占菌体总蛋白质的 31.3%。接种后生长 2 h 和 6 h,目标蛋白质占菌体总蛋白质比例均不高。因此,选择接种生长 4 h 为最佳诱导起始点。

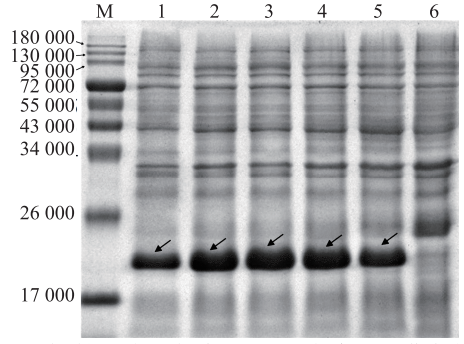
如图 6(c)所示,随着温度的升高,目标蛋白质表达量先升高后降低,30 ℃时达到最大。当 16 ℃和 23 ℃诱导时,目标蛋白质电泳条带在 22 000 处,颜色较浅,但在菌体总蛋白质中的比例分别为 23.5%,25.6%。当诱导温度升高至 44 ℃,目标蛋白质表达量降低。因此,选择 30 ℃为最佳诱导温度。

如图 6(d)所示,诱导时长在 2~6 h 时,目的蛋白质表达量随诱导时间而逐渐增加;超过 6 h 时,目标蛋白质表达逐渐降低。因此,选择 6 h 为最佳诱



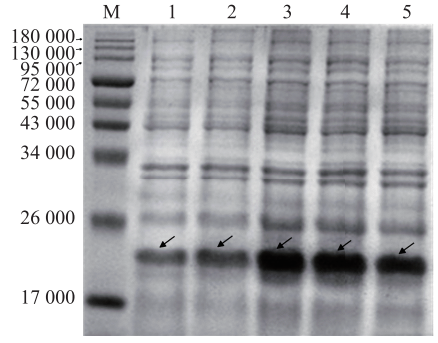

M. 蛋白质相对分子质量标准;1~5. IPTG终浓度为0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L;6. 未诱导。

(a) IPTG浓度



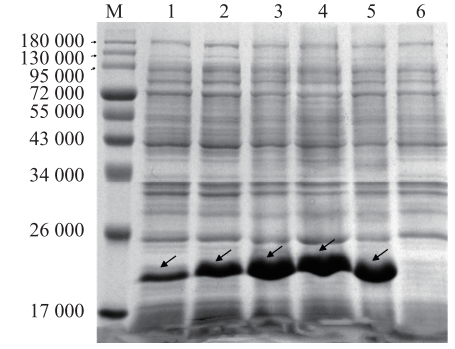

M. 蛋白质相对分子质量标准;1~5. 分别是重组菌接种2、3、4、5、6 h开始IPTG诱导;6. 未诱导。

(b) 诱导起始点




M. 蛋白质相对分子质量标准;1~5. 诱导温度分别是16、23、30、37、44 ℃。

(c) 诱导温度




M. 蛋白质相对分子质量标准;1~5. 诱导时长分别是2、4、6、8、10 h;6. 未诱导。

(d) 诱导时长

**图 6 诱导条件对重组 PcCRA2 表达的影响**

**Fig. 6 The expression of PcCRA2 at different conditions**

导时长。

诱导最佳条件为：接种 4 h 后加入 0.5 mmol/L 的 IPTG，于 30 ℃诱导 6 h。

**2.4.3 重组 PcCRA2 与虾青素特异性结合** 重组 PcCRA2 的 Tris-HCl 溶液在 270 nm 处出现单峰，见图 7。虾青素的丙酮溶液在 474 nm 处有最大吸收峰。超滤除去游离虾青素后，重组 PcCRA2 与虾青素反应溶液在 265 nm 和 505 nm 处均出现最大吸收峰，说明重组 PcCRA2 与虾青素发生特异性结合。相比游离虾青素，可见光区最大吸收峰发生了红移，从 474 nm 移至 520 nm 处。

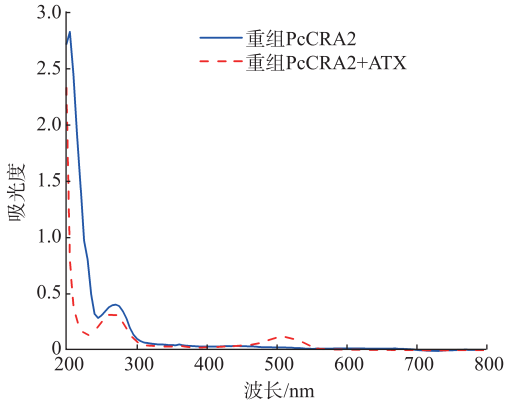



**图 7 重组 PcCRA2 与虾青素特异性结合的 UV-vis 图**

**Fig. 7 UV-vis spectra of the specific binding of recombinant PcCRA2 to astaxanthin**

## 2.5 讨论

通过同源克隆获得了克氏原螯虾 *cra2* 基因的 DNA 和 cDNA 序列，并通过 cDNA 序列获得 PcCRA2 氨基酸序列。PcCRA2 氨基酸序列中含 16 个氨基酸（N 端）的信号肽和 174 个氨基酸的成熟肽，其中 43~184 氨基酸位为 lipocalin 保守结构域，而且具有脂钙蛋白家族 3 个典型区域 SCR-1（G-X-W）、SCR-2(T-D-Y)和 SCR-3(R)，表明 PcCRA2 属于脂钙蛋白家族。这些典型区域在不同物种虾青蛋白中高度保守，说明虾青蛋白该区域在进化上相对保守，这可能与虾青蛋白均具有 $\beta$-桶形空间结构有关[2]。另外，通过基因和氨基酸序列比对，可以确定 PcCRA2 属于虾青蛋白 A2 亚基。迄今为止，在甲壳动物中只发现了 2 个编码虾青蛋白的基因：*cra* 和 *crc* 基因，它们同时或单独存在于同一物种中表达 CR-A 亚型或 CR-C 亚型虾青蛋白[18]。而且，同一亚型虾青蛋白可能在翻译后发生酰胺化或糖基化等修饰，从而导致它们的结构、性质等存在差异[19]。由此，克氏原螯虾 *cra2* 基因属于 *cra* 基因，但是克氏原螯虾中是否还存在 *crc* 基因有待进一步研究。系统进化树显示，PcCRA2 与红螯螯虾、欧洲龙虾、美洲龙虾等聚为一支，说明其与螯虾科虾类有血缘关系，而与对虾科虾类有明显区分。

克氏原螯虾 *cra2* 基因的表达具有组织特异性，在表皮中表达量最高。Tlysty 等人认为虾青素主要在表皮中与虾青蛋白特异性结合形成结合蛋白质，而后转移至甲壳中继续修饰成不同颜色的多聚体[20]。在罗氏沼虾中，*crc* 基因在表皮中的表达量高于其他组织，且在蜕壳期间比其他生长阶段表达高[21]。干扰该基因后，其在表皮中的表达量明显减少，此时虾的体色转变成红色。另外，李清清等人发现 *cra1* 基因在中华绒螯蟹表皮中表达相对较高，而 *crc1* 基因和 *crc2* 基因却在肝胰腺和卵巢中表达更高[22]。他认为前者可能主要参与蟹的色泽调控，后者更多地参与卵巢色泽形成和发育。由此，克氏原螯虾 *cra2* 基因可能主要参与其体色的形成以及色泽的调控，但是具体调控机制有待后续研究。

原核系统具有基因修饰简便、生产周期较短、成本较低等优点，因而在各种蛋白质表达研究中被广泛使用。为获得大量重组 PcCRA2，作者采用大肠杆菌原核表达系统，并使用目前调控 T7 启动子效果最优的乳糖类似物 IPTG 作为诱导剂。考虑到表达元件和外界环境均能影响原核表达效果，对诱导剂终浓度、诱导起始点、诱导温度和诱导时间等条件进行了优化。结果表明，IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时目标蛋白质表达效果较好。尼罗罗非鱼 *Galectin-4* 基因的原核表达条件优化结果显示，IPTG 浓度在 0.4 mmol/L 表达量最大，而在 0.4~1.0 mmol/L 内没有明显增加，与本研究结果相似[23]。当 IPTG 浓度超过 1.0 mmol/L 时，目标蛋白质的表达量下降，这可能是 IPTG 具有潜在毒性，过量会抑制菌体生长和蛋白质表达[24]。以接种后生长 4 h 作为起始诱导点，重组 PcCRA2 表达量最大，此时重组菌处于对数期。诱导处于生长迟缓期和稳定期的菌体均不利于目标蛋白质的表达和积累[25]。在 30 ℃诱导时，目标蛋白质表达效果最好。温度过低，重组菌生长缓慢，菌体密度不高；温度过高，重组菌加速增殖，不利于蛋白质的表达，而且容易使目标蛋白质形成包涵体，增加了后续纯化的难度[26]。诱导 6 h 时，重组 PcCRA2 表达量达到最大，这与哈维氏

弧菌 *PspF* 基因的异源表达条件优化结果一致[27]。

由于大肠杆菌系统表达的蛋白质主要以包涵体形式存在,容易在生成过程中出现未折叠或错误折叠等情况而使重组蛋白质丧失活性,纯化时需要增加复性操作[28]。本研究获得的目标蛋白质包涵体占 78.2%,故采用尿素浓度梯度透析法对其进行了复性。复性后的纯化重组 PcCRA2 能与虾青蛋白特异性结合,在 265 nm 和 505 nm 处出现最大吸收峰。而 Ferrari 等人制备的重组美洲龙虾虾青蛋白 H2 与虾青素结合后,不仅在 580 nm 处出现最大吸收峰,还在 520 nm 处有肩峰[29]。此外,重组 PcCRA2 与虾青素结合率($A_{505}/A_{265}$)为 0.38,略高于 Ferrari 等的实验结果。虽然结合效率不高,但是为后续研究虾青蛋白亚基与虾青素的相互作用提供可能。

## 3 结 语

采用同源克隆获得了克氏原螯虾 *cra2* 基因的 DNA 和 cDNA 序列,RT-qPCR 发现该基因在克氏原螯虾 9 种组织中均有表达,其中表皮表达量最高。构建了表达载体 pET28a-*cra2*,并获得重组 PcCRA2,证实了该蛋白质能与虾青素特异性结合。本研究结果可为获取重组虾青蛋白亚基、探究其生物功能提供参考。

## 参考文献:

[1] WADE N M,BUDD A,IRVIN S,et al. The combined effects of diet,environment and genetics on pigmentation in the Giant Tiger Prawn,*Penaeus monodon*[J]. **Aquaculture**,2015,449:78-86.

[2] BUDD A M,HINTON T M,TONKS M,et al. Rapid expansion of pigmentation genes in penaeid shrimp with absolute preservation of function[J]. **The Journal of Experimental Biology**,2017,220(22):4109-4118.

[3] GAO H,MA H K,SUN J Q,et al. Expression and function analysis of crustacyanin gene family involved in resistance to heavy metal stress and body color formation in *Exopalaemon carinicauda*[J]. **Journal of Experimental Zoology**,2021,336(4):352-363.

[4] 潘创,Shoichiro Ishizaki,吉宏武,等. 南美白对虾壳中虾青蛋白性质的研究[J]. 大连海洋大学学报,2014,29(3):276-280.
PAN C,ISHIZAKI S,JI H W,et al. Characterization of crustacyanin extracted from shells of Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. **Journal of Dalian Ocean University**,2014,29(3):276-280. (in Chinese)

[5] BEGUM S,CIANCI M,DURBEEJ B,et al. On the origin and variation of colors in lobster carapace[J]. **Physical Chemistry Chemical Physics**,2015,17(26):16723-16732.

[6] CHAYEN N E,CIANCI M,GROSSMANN J G,et al. Unravelling the structural chemistry of the colouration mechanism in lobster shell[J]. **Acta Crystallographica**,2003,59(12):2072-2082.

[7] GAMIZ-HERNANDEZ A P,ANGELOVA I N,SEND R,et al. Protein-induced color shift of carotenoids in β-crustacyanin[J]. **Angewandte Chemie**,2015,54(39):11564-11566.

[8] STRAMBI A,DURBEEJ B. Excited-state modeling of the astaxanthin dimer predicts a minor contribution from exciton coupling to the bathochromic shift in crustacyanin[J]. **The Journal of Physical Chemistry**,2009,113(15):5311-5317.

[9] CHAYEN N E,CIANCI M,OLCZAK A,et al. Apocrustacyanin A1 from the lobster carotenoprotein alpha-crustacyanin: crystallization and initial X-ray analysis involving softer X-rays[J]. **Acta Crystallographica. Section D,Biological Crystallography**,2000,56(8):1064-1066.

[10] 赵保国,蒋苏丹,汪长天,等. 培养条件及添加剂对重组荧光藻蓝蛋白β亚基胞外分泌的影响[J]. 食品与发酵工业,2020,46(12):193-198.
ZHAO B G,JIANG S D,WANG C T,et al. Effects of culture conditions and additives on extracellular secretion of a recombinant fluorescent beta-subunit phycocyanin[J]. **Food and Fermentation Industries**,2020,46(12):193-198. (in Chinese)

[11] KUDDUS M,SINGH P,THOMAS G,et al. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin[J]. **BioMed Research International**,2013,2013:742859.

[12] 王丹. 2021 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2021.

[13] 徐滨,魏开金,朱祥云,等. MS-222 和丁香酚对克氏原螯虾幼虾耗氧率、排氨率及窒息点的影响[J]. 大连海洋大学学报,2018,33(4):455-459.
XU B,WEI K J,ZHU X Y,et al. Effects of MS-222 and clove oil on oxygen consumption rate,ammonia excretion rate and asphyxial point of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. **Journal of Dalian Ocean University**,2018,33(4):455-459. (in

Chinese)

[14] 刘栋梁,黄建华,杨丽诗,等. 多种环境因子对克氏原螯虾蜕壳死亡的影响及对策研究[J]. 南方水产科学,2020,16(2):29-35.
LIU D L,HUANG J H,YANG L S,et al. Effects of multiple environmental factors on molting death of *Procambarus clarkii* and countermeasures[J]. **South China Fisheries Science**,2020,16(2):29-35. (in Chinese)

[15] 李飞,刘士力,卞玉玲,等. 池塘和稻田养殖克氏原螯虾肠道微生物对比分析[J]. 安徽农业大学学报,2021,48(3):423-428.
LI F,LIU S L,BIAN Y L,et al. Comparison of intestinal microbiota of *Procambarus clarkii* in pond and ricefiled culture patterns [J]. **Journal of Anhui Agricultural University**,2021,48(3):423-428. (in Chinese)

[16] PAN C,ISHIZAKI S,NAGASHIMA Y,et al. Functional and structural properties of red color-related pigment-binding protein from the shell of *Litopenaeus vannamei*[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2019,99(4):1719-1727.

[17] TAJIMA N,KUMAGAI T,SAITO Y,et al. Comparative analysis of the relationship between translation efficiency and sequence features of endogenous proteins in multiple organisms[J]. **Genomics**,2021,113(4):2675-2682.

[18] WADE N M,TOLLENAERE A,HALL M R,et al. Evolution of a novel carotenoid-binding protein responsible for crustacean shell color[J]. **Molecular Biology and Evolution**,2009,26(8):1851-1864.

[19] HABASH J,HELLIWELL J R,RAFTERY J,et al. The structure and refinement of apocrustacyanin C2 to 1. 3 A resolution and the search for differences between this protein and the homologous apoproteins A1 and C1[J]. **Acta Crystallographica**,2004,60 (3):493-498.

[20] TLUSTY M F,METZLER A,HUCKABONE S,et al. Morphological colour change in the American lobster (*Homarus americanus*) in response to background colour and UV light[J]. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 2009,43(1):247-255.

[21] YANG F,WANG M R,MA Y G,et al. Prawn lipocalin:characterization of a color shift induced by gene knockdown and ligand binding assay[J]. **Journal of Experimental Zoology**,2011,315(9):562-571.

[22] 李清清. 中华绒螯蟹色泽遗传参数评估及色泽形成机制研究[D]. 上海:上海海洋大学,2019.

[23] 张志强,刘鑫潮,牛金中,等. 尼罗罗非鱼 *Galectin-4* 基因的原核表达及诱导条件优化[J]. 广东海洋大学学报,2020,40(5):118-123.
ZHANG Z Q,LIU X C,NIU J Z,et al. Prokaryotic expression and optimization of *Galectin -4* gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. **Journal of Guangdong Ocean University**,2020,40(5):118-123. (in Chinese)

[24] DVORAK P,CHRAST L,NIKEL P I,et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway[J]. **Microbial Cell Factories**,2015,14:201.

[25] 张煜彬,叶路芬,吴忠秀,等. PD0721 单链抗体的体外原核表达条件优化及蛋白质鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2021,40 (7):42-49.
ZHANG Y B,YE L F,WU Z X,et al. Optimization and identification of prokaryotic expression conditions of PD0721 single-chain antibody *in vitro*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2021,40(7):42-49. (in Chinese)

[26] 吕梦圆,吕永玲,夏祥,等. 大肠杆菌重组几丁质酶的表达、包涵体复性及酶学性质研究[J]. 食品工业科技,2015,36(22):168-172.
LYU M Y,LYU Y L,XIA X,et al. Expression and inclusion body renaturation of recombinant chitinase in *E. coli* and its enzymology properties[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2015,36(22):168-172. (in Chinese)

[27] 马少鸿,黄郁葱,简纪常,等. 哈维氏弧菌PspF 基因的克隆及原核表达分析[J]. 广东海洋大学学报,2019,39(5):1-7.
MA S H,HUANG Y C,JIAN J C,et al. Cloning and prokaryotic expression of PspF gene from *Vibrio harveyi* [J]. **Journal of Guangdong Ocean University**,2019,39(5):1-7. (in Chinese)

[28] 常恒祯,常江,战俊澎,等. 包涵体重组蛋白不同纯化方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志,2021,34(7):862-867.
CHANG H Z,CHANG J,ZHAN J P,et al. Comparison of various methods for purification of recombinant inclusion body protein [J]. **Chinese Journal of Biologicals**,2021,34(7):862-867. (in Chinese)

[29] FERRARI M,FOLLI C,PINCOLINI E,et al. Structural characterization of recombinant crustacyanin subunits from the lobster *Homarus americanus*[J]. **Acta Crystallographica**,2012,68(8):846-853.