

日本七鳃鳗*L-STAT3*的克隆及体内外表达分析

张新妍^{1#} 张文颖^{1,2#} 李庆伟^{1,2,3} 李莹莹^{1,2,3*}

(¹辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116033; ²辽宁师范大学七鳃鳗研究中心, 大连 116033;

³大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连 116081)

摘要 作为信号转导和转录激活子(STAT)蛋白家族的成员之一, 信号转导和转录激活因子3(STAT3)在细胞分化、免疫等众多过程都发挥着重要的作用。该研究在克隆获得日本七鳃鳗*STAT3*全长的基础上, 对其氨基酸序列与其他物种来源的*STAT3*氨基酸序列进行了同源性比对, 将日本七鳃鳗*STAT3*命名为*L-STAT3*。对*L-STAT3*基因分别进行了原核和真核表达, 其中原核表达呈包涵体形式存在。根据毕赤酵母密码子偏好性将*L-STAT3*核苷酸序列进行了密码子优化, 实现了*L-STAT3*在毕赤酵母中的分泌型表达。进一步在转录和蛋白质水平检测了*L-STAT3*基因在七鳃鳗不同组织中的表达情况。该研究构建了适用于日本七鳃鳗功能基因表达的毕赤酵母表达系统, 为后续验证基因功能奠定了基础。对于七鳃鳗*L-STAT3*基因表达模式的分析可为研究七鳃鳗适应性免疫系统发育和调控的过程提供理论基础。

关键词 日本七鳃鳗; *L-STAT3*; 体内体外表达分析

Cloning and Expression Analysis of *Lampetra japonica* *L-STAT3* in Vitro and in Vivo

ZHANG Xinyan^{1#}, ZHANG Wenyong^{1,2#}, LI Qingwei^{1,2,3}, LI Yingying^{1,2,3*}

(¹School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116033, China; ²Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian 116033, China; ³Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116081, China)

Abstract As a member of the STAT (signal transduction and transcriptional activator) protein family, STAT3 plays important roles in many physiological processes, including cell differentiation and immunity. In this study, the full-length of *STAT3* was cloned from *Lampetra japonica* and its amino acid sequence was homologous with those of other species, and then was named as *L-STAT3*. The prokaryotic expression and eukaryotic expression of *L-STAT3* gene were performed respectively, while expression of *L-STAT3* gene in *E. coli* was in the form of inclusion body. The nucleotide sequence of *L-STAT3* was optimized according to the codon preference of *Komagataella phaffii* and the secretion expression of *L-STAT3* could be achieved. The expression of *L-STAT3* gene in different tissues of *L. japonica* was further examined at transcription and protein levels. These attempts provided technical support for obtaining important functional proteins of lamprey and laid a foundation for further verification of lamprey protein functions. In addition, the analysis of the expression pattern of *L-STAT3* can provide a theoretical

收稿日期: 2020-05-15 接受日期: 2020-07-07

国家自然科学基金青年基金(批准号: 3150016)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0411-85827065, E-mail: liyingying16@163.com

Received: May 15, 2020 Accepted: July 7, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation Youth Fund (Grant No.3150016)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-411-85827065, E-mail: liyingying16@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5336>

basis for studying the adaptive immune process of lamprey.

Keywords *Lampetra japonica*; L-STAT3; expression analysis *in vitro* and *in vivo*

作为无颌类脊椎动物的现存代表,七鳃鳗自3.6亿年前(更陶纪)出现以来,其外观几乎没有发生变化,是名副其实的“活化石”^[1]。在进化地位上,七鳃鳗是联系无脊椎动物和脊椎动物间的重要阶元。作为最原始的无颌类脊椎动物,七鳃鳗被认为是研究适应性免疫系统发育和进化的模式生物^[2]。七鳃鳗具备与高等脊椎动物平行进化的适应性免疫系统^[3-4]。在分子、细胞及组织水平上,对于七鳃鳗适应性免疫系统发育研究目前还处于探索阶段^[5],七鳃鳗基因组重复序列多且GC含量高,相近物种基因组序列相似度低,使得大多数商业化抗体无法识别七鳃鳗来源的功能蛋白质,需要自行制备抗体以满足基因功能研究。现有制备多克隆抗体的思路一般是利用原核表达系统表达特定蛋白,免疫动物提取血清并纯化抗体,但是原核表达系统具备自身的劣势,如外源蛋白大多呈包涵体的形式表达,纯化获得蛋白不具备活性,或者根本无法获得表达蛋白,特别是对于七鳃鳗这一特殊物种的蛋白质表达。基于上述问题,亟待构建及优化基于七鳃鳗功能基因的真核表达系统。巴斯德毕赤酵母表达系统具备遗传操作简单及适合高密度发酵等优点,且具备原核表达系统没有的翻译后修饰的能力。此外,毕赤酵母生产成本低、蛋白质表达量高等特点使得毕赤酵母已经成为非常成功的外源蛋白表达系统^[6]。

信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是信号转导和转录激活子(STAT)蛋白家族的成员之一,在细胞分化、免疫等众多生理过程都发挥着极其重要的作用^[7]。STAT属于胞浆蛋白质家族,可被不同的细胞因子受体激活,活化后转入细胞核执行信号转导和转录调控的功能^[8]。在前期研究中,我们利用七鳃鳗肠道共生细菌希瓦氏菌作为抗原免疫七鳃鳗,在蛋白水平上检测了免疫后七鳃鳗外周血白细胞总蛋白质组表达的变化,其中STAT3为差异表达显著的蛋白质之一。在此基础上,本研究以日本七鳃鳗白细胞cDNA为模板克隆获得了STAT3的全长序列,并将其命名为*L-STAT3*。*L-STAT3*基因的氨基酸序列与其他脊椎动物亲缘关系较远,但具备保守的功能域。体外过表达分析显示,*L-STAT3*基因在大肠杆菌呈包涵体形式

表达,而在真核表达宿主毕赤酵母可分泌表达。*L-STAT3*基因在日本七鳃鳗各个组织均有表达,且在各个组织中能够通过差异表达响应肠道希瓦氏菌的免疫。综上,七鳃鳗功能基因表达毕赤酵母表达系统的构建可为获得活性蛋白质提供技术保障,*L-STAT3*分子应答肠道希瓦氏菌的表达模式分析可为研究七鳃鳗适应性免疫系统发育和调控的过程提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

1.1.1 材料 日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)采自黑龙江省松花江流域同江地区,经一段时间的饲养后,选择体表完整及健康的七鳃鳗用于后续实验。

巴斯德毕赤酵母菌株利用YPD培养基培养并保存。用于表达外源蛋白的表达载体和基因分别为:pPICZαA和*L-STAT3*全长cDNA序列。

1.1.2 培养基 (1)YPD(又称YEPD)培养基包括:1%酵母粉、2%胰蛋白胨、2%葡萄糖。固体培养基额外添加2%琼脂粉制成固体平板。

(2)BMGY/BMMY培养基基础配方包括:2%蛋白胨、1%酵母粉、100 mmol pH6.0磷酸盐缓冲液。

1.2 日本七鳃鳗全长基因的克隆、同源性比对及进化分析

分离获得日本七鳃鳗外周血白细胞,提取外周血白细胞mRNA,反转录获得cDNA。利用RACE技术克隆获得日本七鳃鳗*L-STAT3*基因全长序列,利用在线网站ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测了*L-STAT3*氨基酸序列的理化性质;运用在线网站SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对*L-STAT3*蛋白的功能结构域进行了预测;将该基因与其他物种来源的STAT3进行了同源性比对,并利用BioEdit软件将*L-STAT3*氨基酸序列及其具有代表性的鼠、人、斑马鱼、山羊、多育若花鱈、褐家鼠、猪、黄牛、鸡、犬、大西洋鲑及加拿大底鳉的氨基酸序列进行多重序列比对分析;为了进一步分析*L-STAT3*系统发育情况,并了解该蛋白的进化史,将上述下载的序列通过MEGA 7.0软件进行了系统发育分析。

1.3 L-STAT3的原核表达

以日本七鳃鳗白细胞cDNA为模板,用带有相应酶切位点的引物进行PCR扩增引入限制性酶切位点,其中引物序列如下:*L-STAT3*-F为5'-CCG CTC GAG ATG GCG CAG TGG AAC AAG C-3',*L-STAT3*-R为5'-CCC AAG CTT TCA GAG GGT CGA TGT GGG A-3'。将*L-STAT3*基因连接pCold I载体,获得融合表达载体*L-STAT3*-pCold I,转化*E. coli* Rosetta表达菌株,对测序正确的菌株保菌进行后续研究。将转化菌株接种于含有Amp抗性的液体培养基中活化,接种至5 mL LB培养基中,37 °C、180 r/min培养至 D_{600} 值为0.5。取1 mL菌液用不加IPTG的阴性对照,然后按照1:1 000的比例加入IPTG,进行诱导表达。分别选取16 °C和28 °C进行诱导,将诱导后的菌液超声波破碎后4 °C、12 000 r/min离心25 min,分别取上清、沉淀,制备蛋白质样品进行SDS-PAGE检测。

1.4 L-STAT3毕赤酵母真核表达

1.4.1 L-STAT3氨基酸序列的优化及连接pPICZ α A载体 重组蛋白质的表达受密码子利用的影响较大^[9-10],特别是对于基因组GC含量高的物种,因此需要针对毕赤酵母密码子偏好性对*L-STAT3*的核苷酸序列进行优化,使得*L-STAT3*基因能够在毕赤酵母中获得更好的表达。将优化后的序列合成并进一步连接pPICZ α A表达载体,并将融合载体命名为*L-STAT3*-pPICZ α A。pPICZ α A载体是毕赤酵母蛋白表达载体,含有一个C-端多肽,融合了c-Myc和c-His标签,可用于重组蛋白质的验证和纯化。此外,该载体包含*AOX1*启动子,该启动子为甲醇诱导型启动子,外源蛋白的表达受到甲醇的严格调控。

1.4.2 L-STAT3毕赤酵母表达体系的优化 利用电转化的方法^[11-12]将*L-STAT3*-pPICZ α A及pPICZ α A空载体分别转化到毕赤酵母GS115菌株,筛选阳性菌株,提取转化菌株的基因组DNA,利用PCR扩增*L-STAT3*基因序列验证转化成功与否。

配制YPD培养基用于菌株的活化及扩繁,配制BMGY培养基用于外源蛋白质的表达。分别将融合蛋白菌株(转化*L-STAT3*-pPICZ α A的毕赤酵母GS115菌株)、空载体菌株(转化pPICZ α A载体的毕赤酵母GS115菌株)和野生型菌株(毕赤酵母GS115菌株)在YPD培养基中培养,待 D_{600} 达到0.4~0.6后离心收集菌体,将菌体转入BMGY培养基继续培养,在培养0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h及144 h时往培养基集

中添加过滤后的甲醇,终浓度为1%。并在上述时间点分别取培养基上清,利用SDS-PAGE检测重组蛋白的诱导表达情况,并分析*L-STAT3*表达的最佳时间点。

1.5 毕赤酵母表达L-STAT3的鉴定

将纯化后的*L-STAT3*蛋白交由北京勤邦生物技术有限公司制备多克隆抗体。分析上述各个时间点*L-STAT3*的表达情况,利用WB(Western blot)技术鉴定蛋白质是否成功表达。将SDS-PAGE凝胶转化PVDF膜,封闭膜,一抗分别选择了*L-STAT3*多克隆抗体(稀释比例1:700)和c-Myc标签抗体(稀释比例1:500),二抗(稀释比例1:5 000)为辣根过氧化物酶标记的IgG(Goat Anti-Rabbit IgG/HRP, D110058-0100,生工生物工程(上海)股份有限公司)。二抗能与一抗特异性结合并用于信号放大,并进行底物显色验证蛋白质表达情况。

1.6 L-STAT3基因的表达模式分析

对体外分离获得的希瓦氏菌进行摇菌培养,将菌液离心去除培养基,用0.9%氯化钠溶液重悬菌体,制备 10^7 个/mL的菌悬液。实验组6尾分别腹腔注射 10^7 个希瓦氏菌,对照组6尾分别腹腔注射1 mL生理盐水。免疫一周后,再用同样的方法免疫。经过两周免疫刺激后,无菌条件下解剖七鳃鳗获得各个组织保存备用。

分别提取日本七鳃鳗不同组织的总RNA,利用反转录试剂盒将mRNA反转录成cDNA。运用qPCR试剂盒(RR820A, TaKaRa),以七鳃鳗的类淋巴细胞、心脏、肝脏、肠、肾脏、鳃、髓、肌肉、性腺的cDNA为模板,qPCR反应检测*L-STAT3*在各组织中的表达情况。此外,利用制备的*L-STAT3*多克隆抗体,将*L-STAT3*重组蛋白和来源于七鳃鳗肌肉和白细胞的天然蛋白分别进行了WB检测,其中步骤如下:利用BCA Protein Assay Kit分别对*L-STAT3*重组蛋白和天然蛋白进行了浓度测定,将*L-STAT3*重组蛋白和天然蛋白进行SDS-PAGE检测;将带有蛋白质样品的凝胶与PVDF膜结合,95 V恒压转膜70 min,使蛋白样品转移到PVDF膜上;配制5%封闭液37 °C、100 r/min封闭2 h;使用制备的*L-STAT3*多克隆抗体作为一抗(稀释比例1:700),二抗(稀释比例1:5 000)为辣根过氧化物酶标记的IgG,最后进行ECL显色。

2 结果

2.1 日本七鳃鳗L-STAT3基因全长的克隆及表达

利用RACE技术扩增获得了日本七鳃鳗*L-STAT3*

编码基因的全长, 利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增序列, 并回收该序列连接pMD19T-simple vector, 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取阳性克隆测序。氨基酸同源性比对分析显示, L-STAT3与其他物种STAT3同源性高。因此, 将L-STAT3划分为STAT家族蛋白质。我们将L-STAT3基因ORF区核苷酸序列提交到了Genbank, 其登录号为: MT655994。

预测了L-STAT3氨基酸序列的理化性质, 该基因ORF区包含2 124个碱基, 编码708个氨基酸, 分子量为89 050.73 kDa, 总原子数为12 526, 氨基酸分子式为 $C_{3982}H_{6259}N_{1067}O_{1188}S_{30}$, pI值为6.01, 脂肪系数为87.40, 总平均亲水系数(GRAVY)为-0.472, 不稳定系数(II)为51.57, 综上信息, L-STAT3为疏水性且不稳定蛋白质。此外, 该蛋白质含有1个位于2至122位氨基酸处的STAT_int保守结构域, 以及位于596至680氨基酸处的SH2保守结构域, 还有3个复合螺旋区, 分别位于137至173位、211至242位及283至307位氨基酸。将L-STAT3氨基酸序列与其他物种来源的STAT3序列进行了比对, 其比对结果如图1所示。结果显示, L-STAT3分子氨基酸序列特别是功能域序列与其他物种同源性较高, 表明L-STAT3在进化过程中是比较保守的。系统发育分析结果显示, L-STAT3氨基酸序列在进化与其他脊椎动物亲缘关系

较远(图1)。

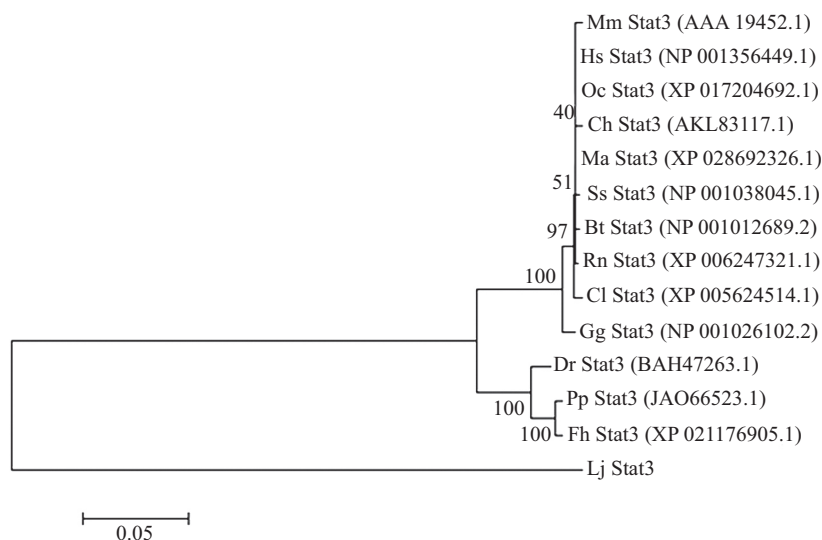
2.2 L-STAT3的原核表达

分别尝试了不同诱导温度、不同诱导时间以及不同诱导剂浓度对L-STAT3表达的影响, 结果发现, 诱导剂IPTG比例为1:1 000, 16 °C、24 h条件下L-STAT3表达量较好, 但是L-STAT3主要在沉淀中表达, 在上清中几乎没有表达(图2)。摸索了各种条件的复性, 均没有获得L-STAT3的可溶性表达。

2.3 L-STAT3的真核表达

根据巴斯德毕赤酵母偏爱密码子对日本七鳃鳗L-STAT3基因的核苷酸序列在不改变编码氨基酸序列的前提下进行了优化, 使得该基因更适于在毕赤酵母中进行表达(图2)。将优化后的序列连接pPICZαA载体, 其中载体连接的酶切验证图谱见图3A。将重组载体(L-STAT3-pPICZαA)和空载体(pPICZαA)分别转化毕赤酵母GS115菌株, 待长出菌落后提取待选阳性克隆的基因组DNA, PCR扩增L-STAT3基因序列, 检测是否转化成功, 其中毕赤酵母转化阳性克隆检测见图3B。将验证正确的阳性克隆保菌备用。

将上述验证正确的阳性菌株利用YPD培养基活化后, 将菌株置于BMGY培养基利用甲醇诱导进

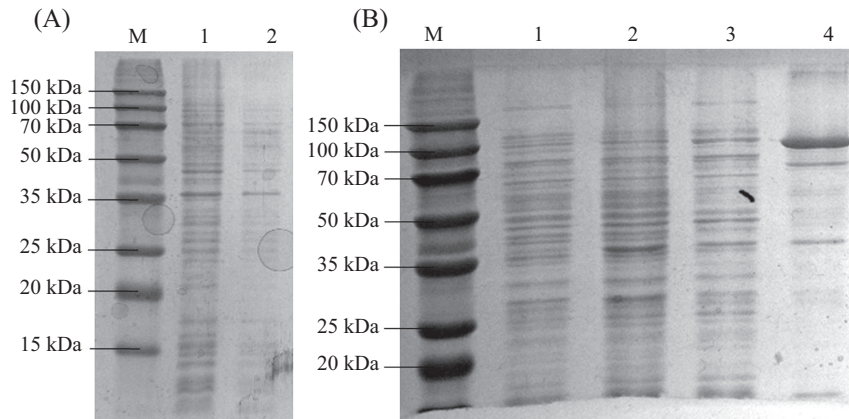


比例尺(0.05)表示遗传距离。Lj: 日本七鳃鳗; Mm: 小鼠; Dr: 斑马鱼; Ch: 山羊; Pp: 多育若花鱗; Rn: 褐家鼠; Ss: 野猪; Bt: 牛; Gg: 鸡; Cl: 家犬; Oc: 家兔; Fh: 底鱗; Hs: 人。

Scale bar (0.05) indicates genetic distance. Lj: *Lampetra japonica*; Mm: *Mus musculus*; Dr: *Danio rerio*; Ch: *Capra hircus*; Pp: *Poeciliopsis prolifica*; Rn: *Rattus norvegicus*; Ss: *Sus scrofa*; Bt: *Bos taurus*; Gg: *Gallus gallus*; Cl: *Canis lupus familiaris*; Oc: *Oryctolagus cuniculus*; Fh: *Fundulus heteroclitus*; Hs: *Homo sapiens*.

图1 L-STAT3的系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of L-STAT3

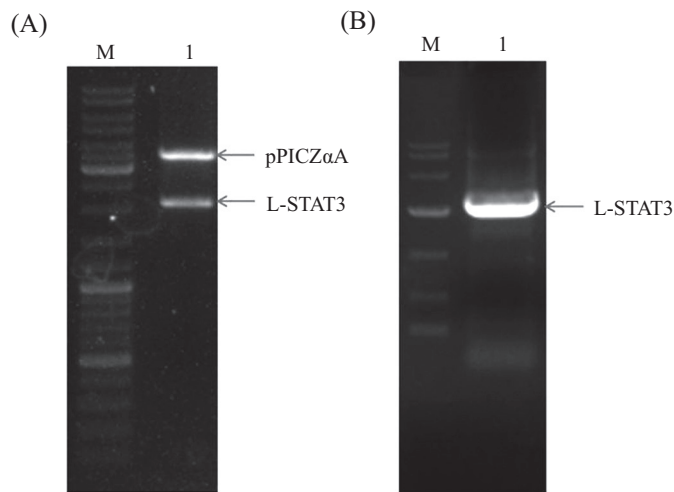


A: 大肠杆菌野生菌株诱导前后蛋白质表达检测。M: 蛋白质分子量marker; 1: 空白对照克隆未诱导全样; 2: 空白对照克隆诱导全样; B: 转化 pCold I-L-STAT3重组大肠杆菌诱导前后蛋白质表达检测。M: 蛋白质分子量marker; 1: 阳性克隆未诱导上清; 2: 阳性克隆未诱导沉淀; 3: 阳性克隆诱导上清; 4: 阳性克隆诱导沉淀。

A: protein expression of wild type *E. coli* strain. M: protein marker; 1: total protein of the un-induced wild strain; 2: total protein of the induced wild strain; B: protein expression of pCold I-L-STAT3 recombinant *E. coli* before and after induction. M: protein marker; 1: supernatant of un-induced positive clone; 2: precipitation of un-induced positive clone; 3: supernatant of induced positive clone; 4: precipitation of induced positive clone.

图2 pCold I-L-STAT3重组蛋白在大肠杆菌的表达

Fig.2 pCold I-L-STAT3 expression using *E. coli* as the host



A: L-STAT3真核表达载体的构建。M: DNA分子量marker; 1: *L-STAT3*-pPICZ α A双酶切验证; B: 转化酵母的验证。M: DNA分子量marker; 1: 转化酵母菌株L-STAT3扩增检测。

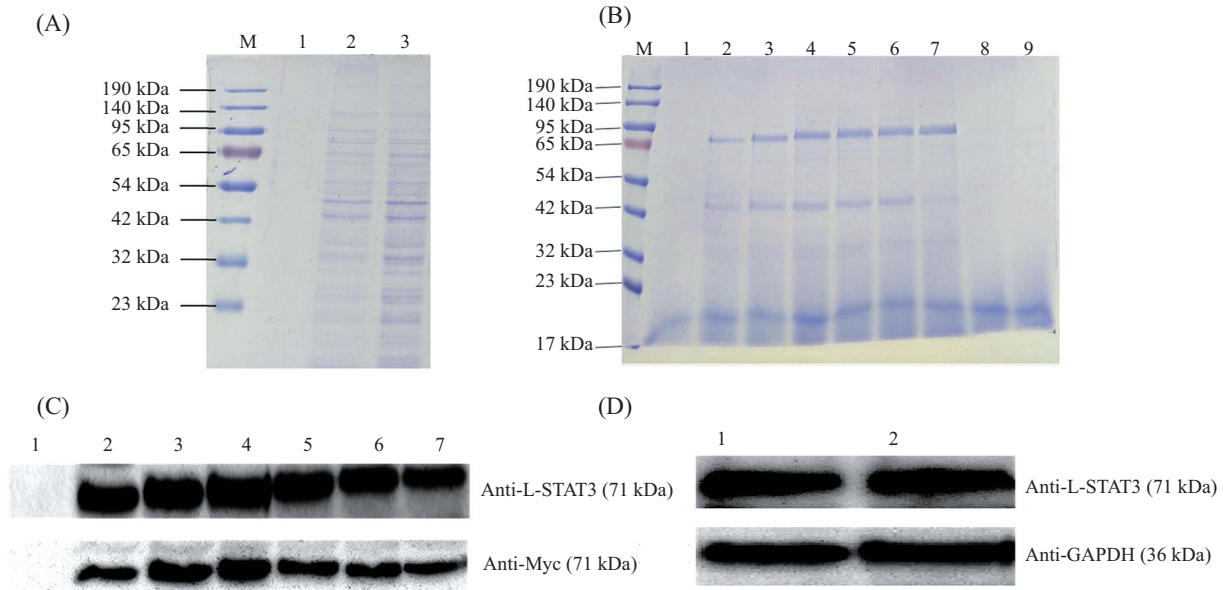
A: construction of L-STAT3 eukaryotic expression vector; M: DNA marker; 1: double digestion verification of *L-STAT3*-pPICZ α A; B: verification of transformed yeast. M: DNA marker; 1: L-STAT3 amplification from transformed yeast.

图3 L-STAT3毕赤酵母真核表达载体构建及转化酵母菌的验证

Fig.3 Construction of L-STAT3 eukaryotic expression vector and verification of transformed yeast

行L-STAT3基因的体外表达。由于pPICZ α A包含用于蛋白分泌的信号肽序列,因此,通过检测诱导培养基上清蛋白的表达情况并结合目标蛋白质和标签蛋白质的WB检测即可鉴定蛋白是否成功表达。优化了L-STAT3的毕赤酵母表达体系,其中最佳培养条件为:在诱导表达体系里边添加甲醇的终浓度为1%,诱导120 h后L-STAT3表达量最高。与空载体、野生菌及未优化密码子L-STAT3表达相比,整合了重组载

体的毕赤酵母菌株在培养基上清中检测到了目标蛋白质的表达,且大小与预测蛋白质的分子量一致。其中L-STAT3密码子未优化前,在培养基上清及酵母菌细胞总蛋白中均没有检测到L-STAT3的表达(图4A),而密码子优化后分别检测了诱导0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h及144 h培养基上清液,其中在第24 h就检测到了蛋白质的表达,且随着诱导时间的增加,蛋白表达量逐渐增加,在第120 h表达量最高(图4B)。



A: 密码子优化前L-STAT3毕赤酵母甲醇诱导表达检测。M: 蛋白质分子量marker; 1: L-STAT3重组酵母1%甲醇诱导96 h培养基上清; 2、3: L-STAT3重组酵母1%甲醇诱导96 h酵母细胞总蛋白; B: 密码子优化后L-STAT3毕赤酵母甲醇诱导表达检测。M: 蛋白质分子量marker; 1~7: L-STAT3重组酵母1%甲醇诱导0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h及144 h后表达产物检测; 8、9: 野生酵母菌株及转化空载体酵母菌株1%甲醇诱导表达产物检测; C: L-STAT3和Myc标签WB杂交鉴定。1: 蛋白质分子量Marker; 2~7: L-STAT3和Myc标签蛋白质的WB检测; D: L-STAT3重组蛋白的WB验证; 1: L-STAT3重组酵母1%甲醇诱导96 h表达产物WB检测; 2: L-STAT3重组酵母1%甲醇诱导120 h表达产物WB检测。

A: L-STAT3 expression in *K. phaffii* before codon optimization. M: protein marker; 1: medium supernatant of L-STAT3 expression after inducing by 1% methanol for 96 h; 2,3: total yeast cell protein of L-STAT3 expression after inducing by 1% methanol for 96 h; B: L-STAT3 expression in *K. phaffii* after codon optimization. M: protein marker; 1-7: L-STAT3 expression after inducing by 1% methanol for 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h; 8,9: wild type strain after inducing by 1% methanol for 120 h and 144 h; C: L-STAT3 was expressed by fusing with Myc tag proteins. Therefore, the verification of L-STAT3 expression can be done through blotting L-STAT3 protein and Myc tag protein. 1: protein marker; 2-7: L-STAT3 expression after inducing by 1% methanol; D: WB verification of recombinant L-STAT3; 1: WB verification of L-STAT3 expression after inducing by 1% methanol for 96 h; 2: WB verification of L-STAT3 expression after inducing by 1% methanol for 120 h.

图4 pPICZ α A-L-STAT3重组型毕赤酵母诱导表达及WB验证

Fig.4 Induced expression of pPICZ α A-L-STAT3 using *Komagataella phaffii* as the host and WB verification

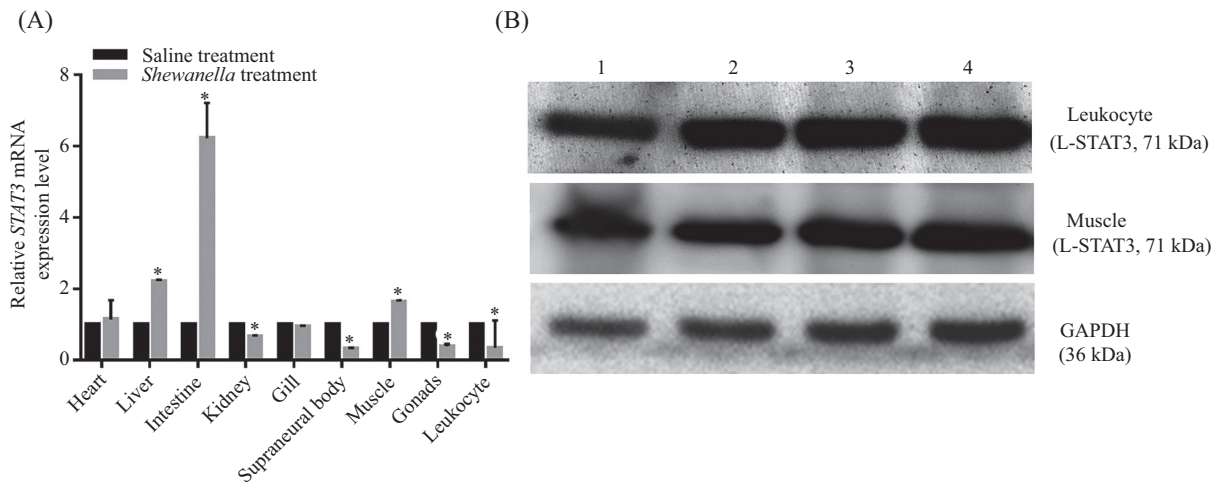
为了证实培养基上清蛋白是否为目标蛋白质, 利用Myc标签抗体和L-STAT3多克隆抗体对培养基上清蛋白质抗原进行了WB验证, 在目标大小的位置都检测到了清晰的Myc标签蛋白和L-STAT3目的蛋白的条带, WB结果进一步证实了上清蛋白即为目的蛋白质(图4C)。将甲醇诱导物进行了WB检测, 也杂交获得了目的条带(图4D)。

2.4 L-STAT3基因的体内表达分析

利用qPCR分析了日本七鳃鳗L-STAT3基因在不同组织转录水平上的表达, 结果显示, L-STAT3基因在七鳃鳗不同组织均有表达, 且在心脏、肠及口腔腺中表达量较高, 在其他组织相对较低。经希瓦氏菌免疫后, L-STAT3基因在肠、口腔腺及白细胞中的表达量降低(图5A)。在蛋白质水平上, 利用制备的多克隆抗体检测了L-STAT3七鳃鳗组织中的表达。结果显示, 制备的抗体可以识别七鳃鳗天然蛋白质(图5B), 且条带位置相对应的蛋白质分子量大小正确。

3 讨论

七鳃鳗作为研究生物起源与进化的“活化石”, 具备与高等脊椎动物平行进化的适应性免疫系统, 因此被认为是研究适应性免疫系统起源的模式生物^[5]。七鳃鳗肠道共生细菌组成较简单, 希瓦氏菌为非优势菌群之一^[13]。在前期研究中, 我们将七鳃鳗肠道来源的希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)进行了体外分离, 利用希瓦氏菌作为抗原免疫七鳃鳗能够使得七鳃鳗外周血白细胞VLRA、VLRB和VLRC在转录水平表达上调, 因此推测希瓦氏菌参与了七鳃鳗适应性免疫调控这一过程。进一步将希瓦氏菌调控七鳃鳗外周血白细胞的差异蛋白质组进行了鉴定, 从中获得了其中一个差异表达显著的蛋白质STAT3(结果未正式发表)。本研究将该蛋白质编码基因全长进行了克隆, 并进行了后续分析。生物信息学分析显示, L-STAT3不属于膜蛋白和分泌蛋白, 但含有STAT保守结构域和SH2功能结构域。STAT3的SH2结构域与受体上



A: 希瓦氏菌免疫对L-STAT3基因在七鳃鳗不同组织转录水平上表达的分析, * $P < 0.05$, 与盐水处理组比较; B: L-STAT3七鳃鳗天然蛋白的WB验证; 1: 日本七鳃鳗白细胞和肌肉总蛋白(15 μg); 2: 日本七鳃鳗白细胞和肌肉总蛋白(20 μg); 3: 日本七鳃鳗白细胞和肌肉总蛋白(25 μg); 4: 日本七鳃鳗白细胞和肌肉总蛋白(30 μg)。

A: expression of L-STAT3 gene in different lamprey tissues immunized with *Shewanella*, * $P < 0.05$ compared with saline treatment group; B: WB verification of lamprey leukocyte and muscle protein; 1: Lamprey leukocyte and muscle protein (15 μg); 2: lamprey leukocyte and muscle protein (20 μg); 3: lamprey leukocyte and muscle protein (25 μg); 4: lamprey leukocyte and muscle protein (30 μg).

图5 L-STAT3的表达模式分析

Fig.5 Expression analysis of L-STAT3

的磷酸化酪氨酸残基结合, 在JAK激酶作用下发生磷酸化, 进而启动一系列的信号转导过程^[14]。七鳃鳗L-STAT3氨基酸序列同源性比对显示, 该蛋白与其他物种来源STAT3的功能域存在同源性, 说明L-STAT3在进化过程中是比较保守的。利用系统发育分析了L-STAT3与其他物种STAT3的关系, L-STAT3与其他脊椎动物亲缘关系较远。

七鳃鳗功能基因GC含量高^[15], 相近物种基因组同源性低, 现有商业化抗体不能特异识别来源于七鳃鳗的蛋白质。本研究分别将L-STAT3进行了原核表达和真核表达, 由于L-STAT3分子量较大且存在翻译后修饰, 利用大肠杆菌作为宿主表达出来的蛋白质呈包涵体形式。与原核表达系统相比, 真核表达系统具备诸多优点, 其中一个重要的方面就是表达蛋白质能够分泌到胞外, 形成正确折叠构象的活性蛋白质^[16]。在所有真核表达系统中, 毕赤酵母表达系统自身蛋白表达量低、表达外源蛋白产量高、操作简单、产业化造价低及能够将外源蛋白分泌到胞外等诸多优点, 被列为优良的真核表达宿主^[17]。因此, 基于毕赤酵母为宿主的七鳃鳗功能基因真核表达系统的构建可为深入探究七鳃鳗基因的功能及分子机制提供了有效的工具。目前为止, 已利用毕赤酵母表达系统成功表达了多种有价值的外源蛋白^[18-20], 但是还未有相关报道将七鳃鳗的功能

蛋白置于毕赤酵母中进行表达。基于七鳃鳗基因组特殊的特点, 本研究在构建毕赤酵母表达载体之前先将七鳃鳗功能基因进行了偏爱密码子优化, 使得外源基因更适合在毕赤酵母中进行表达。我们对优化前后的表达效果分别进行了检测, 结果显示, 密码子未优化前不管是细胞内还是细胞外都没能检测到L-STAT3基因的表达, 而优化后则成功使得L-STAT3基因呈现分泌表达。因此, 针对特殊物种, 对稀有密码子根据物种的偏好性进行优化可有效提高蛋白质的表达量^[21-23]。

本研究成功利用毕赤酵母表达系统诱导表达了来源于七鳃鳗的功能蛋白质, 该系统的构建为七鳃鳗功能蛋白质的分离纯化提供了技术支撑, 并为深入分析来源于七鳃鳗重要蛋白质的功能提供了研究基础。分别在转录水平和蛋白质水平上检测了L-STAT3分子在七鳃鳗体内的表达情况, 该分析可为深入探究L-STAT3分子参与的七鳃鳗适应性免疫系统调控过程提供理论基础。

参考文献 (References)

- [1] OSORIO J, RETAUX S. The lamprey in evolutionary studies [J]. Dev Genes Evol, 2008, 218(5): 221-35.
- [2] GUO P, HIRANO M, HERRIN B R, et al. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys [J]. Nature, 2009, 459: 796-801.

- [3] PANCER Z, AMEMIYA C T, EHRHARDT G R, et al. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey [J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 174-80.
- [4] HIRANO M, GUO P, MCCURLEY N, et al. Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys [J]. *Nature*, 2013, 501: 435-8.
- [5] AMEMIYA CT, SAHA NR, ZAPATA A. Evolution and development of immunological structures in the lamprey [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(5): 535-41.
- [6] VALERO F. recent advances in *Pichia pastoris* as host for heterologous expression system for lipases: a review [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1835: 205-16.
- [7] LORENTE D, TRILLA E, MESEGUER A, et al. The role of STAT3 protein as a prognostic factor in the clear cell renal carcinoma. Systematic review [J]. *Actas Urol Esp*, 2019, 43: 118-23.
- [8] XIN P, Xu X, DENG C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. *Int Immunopharmac*, 2020, 80: 106-210.
- [9] KAZMI S O, RODRIGUE N. Detecting amino acid preference shifts with codon-level mutation-selection mixture models [J]. *BMC Evol Biol*, 2019, 19(1): 62.
- [10] BARUAH V J, SATAPATHY S S, POWDEL B R, et al. Comparative analysis of codon usage bias in crenarchaea and euryarchaea genome reveals differential preference of synonymous codons to encode highly expressed ribosomal and RNA polymerase proteins [J]. *J Genet*, 2016, 95(3): 537-49.
- [11] 金由辛, 包慧中, 赵丽云. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [12] CREGG J M, BARRINGER K J, HESSLER A Y, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations [J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12): 3376-85.
- [13] LI Y, XIE W, LI Q. Characterisation of the bacterial community structures in the intestine of *Lampetra morii* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109: 979-86.
- [14] UNGUREANU D, WU J, PEKKALA T, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(9): 971-6.
- [15] SMITH J J, KURAKU S, HOLT C, et al. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 415-21.
- [16] 刘冰, 黄志强, 郑潇, 等. 毕赤酵母外源蛋白分泌途径的研究进展[J]. 微生物学报(LIU B, HUANG Z Q, ZHENG X, et al. Advances in heterologous protein secretory pathway from *Komagataella phaffii* [J]. *Journal of Microbiology*), 2019, 39(4): 83-90.
- [17] BAGHBAN R, FARAJNIA S, GHASEMI Y, et al. New developments in *Pichia pastoris* expression system, review and update [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19: 451-67.
- [18] BORZOOEE F, LARIJANI M. *Pichia pastoris* as a host for production and isolation of mutagenic AID/APOBEC enzymes involved in cancer and immunity [J]. *New biotechnol*, 2019, 51: 67-79.
- [19] GAO L, CAI M, SHEN W, et al. Engineered fungal polyketide biosynthesis in *Pichia pastoris*: a potential excellent host for polyketide production [J]. *Microb Cell Fact*, 2013, 12(1): 77.
- [20] 彭强强, 刘启, 徐名强, 等. 新型重组毕赤酵母产人胰岛素前体的表达工艺研究[J]. 中国生物工程杂志(PENG Q Q, LIU Q, XU M Q, et al. Heterologous expression of insulin precursor in a newly engineered *Pichia pastoris* [J]. *China Biotechnology*), 2019, 39(7): 48-55.
- [21] 冯雪, 高香, 牛纯青, 等. 密码子优化后的 α B-晶状体蛋白基因毕赤酵母重组质粒的构建及表达的初步研究[J]. 中国生物工程杂志(FENG X, GAO X, NIU C Q, et al. Construction of *Pichia pastoris* expression vector of codon optimized α B-crystallin gene and expression optimization [J]. *China Biotechnology*), 2017, 37(7): 42-7.
- [22] LU X, WANG J, JIN X, et al. High-level expression of a novel liver-targeting fusion interferon with preferred *Escherichia coli* codon preference and its anti-hepatitis B virus activity *in vivo* [J]. *BMC Biotechnol*, 2015, 15(1): 54.
- [23] 杨江科, 严翔翔, 黄日波, 等. 米根霉脂肪酶基因pro-ROL和m-ROL在毕赤酵母中的密码子优化、表达和酶学性质的比较分析[J]. 生物工程学报(YANG J K, YAN X X, HUANG R B, et al. Codon optimization, expression and enzymatic comparison of *Rhizopus oryzae* lipases pro-ROL and m-ROL in *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2011, 27(12): 1780-8.