

学校编码: 10384  
学号: 20051302168

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

抗冻蛋白基因 Type III AFP HPLC-12 的原核表达、抗冻活性的鉴定及杂色鲍表达载体的初步构建

**Prokaryotic Expression, Antifreeze Activity Identification of Type III AFP HPLC-12 and Preliminary Construction of the Transgenic Expression Vector of *Haliotis diversicolor***

陈维宇

指导教师姓名: 柯才焕 教授  
专业名称: 海洋生物学  
论文提交日期: 2008年11月7日  
论文答辩时间: 2008年11月4日  
学位授予日期:

答辩委员会主席: 王义权  
评阅人: 喻达辉、阙华勇

2008年11月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要	I
ABSTRACT	III
第一章 文献综述	1
1.1 前言	1
1.2 抗冻蛋白的特性	1
1.2.1 热滞活性	1
1.2.2 修饰冰晶生成形态	2
1.2.3 抑制冰晶重结晶	2
1.3 抗冻蛋白的作用机制	3
1.3.1 “氢键结合”模型	3
1.3.2 “表面互补”模型	4
1.4 抗冻蛋白的分类	5
1.4.1 抗冻糖蛋白	5
1.4.2 I型抗冻蛋白	6
1.4.3 II型抗冻蛋白	6
1.4.4 III型抗冻蛋白	7
1.4.5 IV型抗冻蛋白	8
1.5 昆虫、植物和微生物中的抗冻蛋白	8
1.6 抗冻蛋白转基因的研究现状	9
1.7 水产养殖生物转基因研究的现状	10
1.8 本研究的的目的和意义	12
第二章 III型抗冻蛋白 <i>AFP HPLC-12</i> 基因的克隆、原核表达及抗冻活性的检测	13

<b>2.1</b>	<b>材料</b> .....	<b>14</b>
2.1.1	本章所用试剂与仪器.....	14
2.1.2	实验溶液的配制.....	15
<b>2.2</b>	<b>方法</b> .....	<b>17</b>
2.2.1	<i>AFP</i> 基因序列的克隆.....	17
2.2.1.1	引物设计.....	17
2.2.1.2	<i>AFP</i> 基因克隆.....	18
2.2.1.3	胶回收产物连接 pMD-18T 载体, 转化并测序.....	19
2.2.2	<i>AFP</i> 基因的原核表达.....	20
2.2.2.1	<i>AFP</i> 基因序列转化 BL21 感受态细胞及诱导表达.....	20
2.2.2.2	SDS-PAGE 检测Ⅲ型 <i>AFP</i> 原核表达产物.....	21
2.2.3	<i>AFP</i> 原核表达产物抗冻活性检测.....	22
<b>2.3</b>	<b>结果与分析</b> .....	<b>25</b>
2.3.1	<i>AFP</i> 基因三次片段 PCR 扩增结果.....	25
2.3.2	<i>AFP</i> 基因测序结果.....	25
2.3.3	pGEX-4T- <i>AFP</i> 的 PCR 鉴定.....	28
2.3.4	<i>AFP</i> 原核表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果.....	28
2.3.5	<i>AFP</i> 原核表达产物抗冻活性检测结果.....	29
<b>2.4</b>	<b>讨论</b> .....	<b>34</b>
2.4.1	技术路线的选择.....	34
2.4.2	<i>AFP</i> 抗冻活性的有效性.....	35
<b>第三章 杂色鲍 <i>AFP</i> 表达载体的初步构建</b> .....		<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>本章试剂与仪器</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>方法</b> .....	<b>40</b>
3.2.1	杂色鲍肌动蛋白启动子的克隆.....	40
3.2.1.1	杂色鲍血细胞 RNA 的提取和 ds-cDNA 的获得.....	40
3.2.1.2	血细胞 cDNA 扩增肌动蛋白.....	42

3.2.1.3	基因组 DNA 扩增肌动蛋白	43
3.2.2	杂色鲍表达载体构建	47
3.2.2.1	<i>AFP</i> 基因片段的 <i>Bam</i> H I / <i>Sal</i> I 双酶切	47
3.2.2.2	<i>Actin</i> 启动子的克隆与 <i>Sac</i> I / <i>Eco</i> R I 双酶切	48
3.2.2.3	pIRES-EGFP 质粒的 <i>Bam</i> H I / <i>Sal</i> I 双酶切	49
3.2.2.4	<i>AFP Bam</i> H I / <i>Sal</i> I 双酶切基因序列连接 pIRES-EGFP <i>Bam</i> H I / <i>Sal</i> I 双酶切质粒	49
3.2.2.5	pIRES-EGFP- <i>AFP Sac</i> I / <i>Eco</i> R I 双酶切质粒连接 <i>ActinP</i> 启动子 <i>Sac</i> I / <i>Eco</i> R I 双酶切片段	50
<b>3.3</b>	<b>结果与分析</b>	<b>51</b>
3.3.1	杂色鲍 <i>Actin</i> F/R 扩增结果	51
3.3.2	杂色鲍 <i>Actin</i> UP 步移 PCR 产物凝胶电泳结果	52
3.3.3	杂色鲍肌动蛋白基因序列及分析	52
3.3.4	pMD-18T- <i>AFP</i> 经 <i>Sal</i> I / <i>Bam</i> H I 双酶切的电泳结果	55
3.3.5	pMD-18T- <i>ActinP</i> 后经 <i>Sac</i> I / <i>Eco</i> R I 双酶切的电泳结果	55
3.3.6	pIRES-EGFP 质粒的经 <i>Sal</i> I / <i>Bam</i> H I 双酶切的电泳结果	56
3.3.7	pIRES-EGFP- <i>AFP</i> 经 <i>Sac</i> I / <i>Eco</i> R I 双酶切的电泳结果	57
3.3.8	pIRES-EGFP- <i>AFP-ActinP</i> 的引物扩增鉴定结果	58
<b>3.4</b>	<b>讨论</b>	<b>59</b>
3.4.1	杂色鲍肌动蛋白启动子	59
3.4.2	真核表达载体及报告基因的选择	60
<b>第四章</b>	<b>结论、本课题的不足与研究展望</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>结论</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>本实验存在的不足及研究展望</b>	<b>64</b>
	参考文献	65
	在学期间发表的论文	74

致 谢.....75

厦门大学博硕士学位论文摘要库

**Content**

**Abstract in Chinese**.....I

**Abstract in English** ..... III

**Chapter 1 Literature Review** ..... 错误！未定义书签。

**1.1 Preface**..... 错误！未定义书签。

**1.2 CHARACTERISTICS AND FUNCTION OF THE ANTIFREEZE PROTEIN**..... 错误！未定义书签。

        1.2.1 Thermal Hysteresis Activity .....1

        1.2.2 Morphology Modification of the Generating ice Crystals.....2

        1.2.3 Inhibition of Recrystallization .....2

**1.3 The Mechanism of the Antifreeze Protein** ..... 3

        1.3.1 Model of "Hydrogen-Bonding Match" .....3

        1.3.2 Model of "Surface Complementarity" .....4

**1.4 THE CLASSIFICATION OF THE ANTIFREEZE PROTEIN**..... 5

        1.4.1 Antifreeze Glycoprotein .....5

        1.4.2 Type I Antifreeze Protein .....6

        1.4.3 Type II Antifreeze Protein .....6

        1.4.4 Type III Antifreeze Protein .....7

        1.4.5 Type IV Antifreeze Protein .....8

**1.5 Antifreeze Protein in Insect, Plant and Microorganism** ..... 8

**1.6 The Research Status of Antifreeze Protein Transgene**..... 9

**1.7 The Research Status of Aquatic Organisms Transgene**..... 10

**1.8 Objective and Significance of this Study** ..... 12

**Chapter 2 Synthesis, Prokaryotic Expression and Antifreeze Activity**



<b>Identification of Type III AFP HPLC-12</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Reagent and Instruments in this Chapter .....	14
2.1.2 Preparation of Solution and Culture Medium .....	错误！未定义书签。
<b>2.2 Method</b> .....	错误！未定义书签。
2.2.1 Clone of the AFP Gene .....	错误！未定义书签。
2.2.1.1 Primer design .....	错误！未定义书签。
2.2.1.2 Clone of the AFP Gene .....	错误！未定义书签。
2.2.1.3 Sequencing of the Gel Recovery Product .....	错误！未定义书签。
2.2.2 Prokaryotic Expression of AFP Gene .....	错误！未定义书签。
2.2.2.1 Prokaryotic Expression of the Transformed BL21 Competence .....	错误！未定义书签。
2.2.2.2 The Identification of the Product of Prokaryotic Expression by SDS-PAGE .....	错误！未定义书签。
2.2.3 Antifreeze Activity Identification of the Product of Prokaryotic Expression .....	错误！未定义书签。
<b>2.3 Results and Analysis</b> .....	错误！未定义书签。
2.3.1 PCR results of the Three Times Amplified AFP Gene .....	错误！未定义书签。
2.3.2 Sequencing Result of AFP Gene .....	错误！未定义书签。
2.3.3 PCR Identification of Vector pGEX-4T-AFP .....	错误！未定义书签。
2.3.4 SDS-PAGE Result of the Product of Prokaryotic Expression .....	错误！未定义书签。
2.3.5 Result of Antifreeze Activity Identification of the Product of Prokaryotic Expression .....	29
<b>2.4 Discussion</b> .....	错误！未定义书签。
2.4.1 Choice of technical route .....	错误！未定义书签。
2.4.2 Effectiveness of AFP Antifreeze Activity .....	错误！未定义书签。

**Chapter 3 Construction of AFP Expression Vector of *H.diversicolor***

*diversicolor* ..... 错误！未定义书签。

**3.1 Reagent and Instruments in this Chapter ..... 39**

**3.2 Method ..... 39**

3.2.1 Clone of the *Actin* Primer of *H.diversicolor diversicolor* .....39

3.2.1.1 RNA Extraction of Blood Cell of *H.diversicolor diversicolor* and Obtain of ds-cDNA .....39

3.2.1.2 *Actin* Gene amplified in Blood Cell cDNA ..... 错误！未定义书签。

3.2.1.3 *Actin* Gene amplified in Genomic DNA ..... 错误！未定义书签。

3.2.2 Construction of AFP Expression Vector of *H.diversicolor diversicolor* 错误！未定义书签。

3.2.2.1 *Bam* H I / *Sal* I Digestion of AFP Gene ..... 错误！未定义书签。

3.2.2.2 Clone and *Sac* I / *Eco* R I Digestion of *Actin* Primer ..... 错误！未定义书签。

3.2.2.3 *Bam* H I / *Sal* I Digestion of Vector pIRES-EGFP .....48

3.2.2.4 The Link of *Bam* H I / *Sal* I digested AFP Gene and Vector pIRES-EGFP .....49

3.2.2.5 The Link of *Sac* I / *Eco* R I Digested *ActinP* Primer and Vector pIRES-EGFP-AFP ..... 错误！未定义书签。

**3.3 Results and Analysis ..... 错误！未定义书签。**

3.3.1 Result of Amplification by Primers *Actin* F/R ..... 错误！未定义书签。

3.3.2 Result of Gene-Walking PCR Product of *Actin* UP ..... 错误！未定义书签。

3.3.3 Sequence Analysis of *Actin* Gene of *H.diversicolor diversicolor* ..... 错误！未定义书签。

3.3.4 Result of *Sal* I / *Bam* H I Digested Vector pMD-18T-AFP ..... 错误！未定义书签。

3.3.5 Result of *Sac* I / *Eco* R I Digested Vector pMD-18T-*ActinP* ..... 错误！未定义书签。

3.3.6	Result of <i>Sal</i> I / <i>Bam</i> H I Digested Vector pIRES-EGFP	错误! 未定义书签。
3.3.7	Result of <i>Sac</i> I / <i>Eco</i> R I Digested Vector pIRES-EGFP-AFP	错误! 未定义书签。
3.3.8	Results of PCR Identification of Vector pIRES-EGFP-ActinP-AFP	错误! 未定义书签。
<b>3.4</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>59</b>
3.4.1	<i>Actin</i> Primer of <i>H.diversicolor diversicolor</i>	59
3.4.2	Choice of Eukaryotic Expression Vector and Reporter Gene	60
<b>Chapter 4 Conclusions, Deficiency and Subsequent Study</b>		<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>DEFICIENCY AND SUBSEQUENT STUDY</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCES</b>		<b>66</b>
<b>PUBLISHED PAPERS DURING STUDY</b>		<b>74</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENT</b>		<b>75</b>

## 摘要

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 是我国南方重要的水产养殖种类, 近年来由于诸多原因, 其海产养殖业中的比例逐年下降。本文的研究目的即是以Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 抗冻蛋白序列构建杂色鲍 *AFP* 转基因载体。希望利用此载体通过转基因的方法使杂色鲍获得耐低温、抗冻性状, 快速培育杂色鲍新品种, 向中国北部沿海方向扩大杂色鲍的养殖范围。

按照去除其前部的信号肽序列保留 *AFP* 功能区 (261 bp) 的Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 序列设计引物, 合成Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 基因序列, 同时在片段两端分别增加 *BamH I* 和 *Sal I* 酶切位点。测序结果表明克隆所得序列全长为 275 bp, 去掉两端酶切位点后长度为 261 bp, 共编码 87 个氨基酸残基, 多肽分子重量为 9.284 kDa, 克隆所得片段序列与目的片段完全吻合。IPTG 原核诱导后 SDS-PAGE 检验结果表明, *AFP/GST* 融合蛋白条带位于约 35 kDa 处, 符合其正常的蛋白分子质量大小 (26 + 约 9 kDa), 证明合成的Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 基因片段具有原核转录活性。

以转化空载体 pGEX-4T-2 的 BL 21 细胞悬浮液为对照, 对Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 的原核诱导表达蛋白进行冷冻保护实验。结果表明, 在 0 °C 下, 冷冻时间分别为 72 h、96 h 和 120 h 时, 两种细菌的存活率差异显著 ( $P < 0.05$ ); 在 -20 °C 下, 冷冻时间为 24 h, 存活率差异即表现出了显著性 ( $P < 0.05$ ), 冷冻时间分别为 72 h、96 h 和 120 h 时的存活率差异为极显著 ( $P < 0.01$ )。细菌冷冻保护实验证明原核诱导表达的Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 在 0 °C 和 -20 °C 下均具有抗冻生物学活性。

首次获得了长度为 632 bp 的杂色鲍肌动蛋白启动子 *ActinP* 序列区域, (GenBank 登陆号为 EU622901), 具有两个 CAAT BOX, 分别位于 472 bp 和 559 bp 处, 具有一个 TATA BOX, 位于 591 bp 处; 启动子长度为 50 bp, 位于 583 bp-632 bp, 位于 623 bp 处的 T 经软件分析推测为转录的起始位点, 同时推测从 TATA BOX 开始到转录起始位点 T 结束的这段序列可能组成了杂色鲍肌动蛋白启动子的核心序列, 对于杂色鲍肌动蛋白的转录具有关键性的调控作用。

以 EGFP 为报告分子, 采用定向插入片段方式构建Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 杂色鲍表达载体 pIRES-EGFP-ActinP-AFP。经Ⅲ型 *AFP HPLC-12* 引物与 *ActinP* 引物

PCR 鉴定证明，载体初步构建成功，为III型 *AFP HPLC-12* 基因转化杂色鲍做出了基础性的工作。

关键词：杂色鲍；抗冻蛋白；转基因；载体构建

厦门大学博硕士论文摘要库

**Abstract**

Small abalone, *Haliotis diversicolor* is an important aquaculture species in South China. In recent years, because of a series of reasons, the proportion of the small abalone in the aquaculture is decreasing year by year. The objective of this study is to construct the transgenic vector with the sequence fragment of the antifreeze protein type III *AFP HPLC-12*. By the method of transgene, we hope the transgenic small abalone obtain the low temperature tolerance and the antifreezing character so that enlarge the culture area to the seashore of North China.

Primers were designed according to the encoding gene of the type III *AFP HPLC-12* of which the sequence of the signal peptide had been removed. The type III *AFP HPLC-12* was cloned by the method of gene synthesis and restriction sites of *Bam* H I and *Sal* I was added to the two ends respectively. Sequencing showed that the full-length of the cloned DNA is 275 bp (261 bp not including the restriction sites), encodes 87 amino acid residues and the deduced peptide has a molecular weight of 9.284 kDa. The cloned DNA sequence is completely consistent with the target fragment. After induced by IPTG, cells were sampled by SDS-PAGE identification. Results showed that the band of the AFP/GST fusion protein was about 35 kDa and consisted with the expected molecular weight (26 + about 9 kDa). The result of the SDS-PAGE proved that the synthesized sequence of the type III *AFP HPLC-12* gene has the prokaryotic transcription activity.

Cryoprotective experiments were employed to test the antifreeze activity of the cells embodied *AFP HPLC-12* gene while the cells without *AFP HPLC-12* were chosen as the controls. Results showed that, at 0 °C, the survival probability differences of the two kinds of the bacteria were significant ( $P < 0.05$ ) when the freezing time were 72 h, 96 h and 120 h; at -20 °C, the difference was significant ( $P < 0.05$ ) when the freezing time was 24 h, and the difference was extremely significant ( $P < 0.01$ ) when the freezing time were 72 h, 96 h and 120 h. The result of the cryoprotective experiments showed that the type III *AFP HPLC-12* within prokaryotic expression has the antifreezing biological activity at the temperature 0 °C

and -20 °C.

The promoter region (*ActinP*) of the *Actin* of the small abalone was first obtained of which the length is 632 bp. There are two CAAT BOXes located at 472 bp and 559 bp meanwhile there is one TATA BOX located at 591 bp. The length of the promoter which located at 583 bp-632 bp is 50 bp. The Thymine located at 623 bp was analyzed and conjectured to be the transcription initiation site by the analysis software, and the sequence which from TATA BOX to the Thymine also was conjectured to be the core sequence of the *Actin* protein promoter of *H. diversicolor*, it could play a critical role in transcription of the *Actin* protein. The sequence of the *Actin* protein promoter of *H. diversicolor*, has been submitted into GenBank, the accession number is EU622901.

The type III *AFP HPLC-12* transgenic vector pIRES-EGFP-ActinP-AFP for *H. diversicolor* was constructed, which the EGFP was as the reporter molecule by the method of directional fragment insertion. The vector was identified successfully by PCR with the primers of the type III *AFP HPLC-12* and the ActinP. This study was prophase work of the transgenic type III *AFP HPLC-12 H. diversicolor*.

Key Words: *Haliotis diversicolor*; Antifreeze Proteins; Transgenic; Vector Construction.

## 第一章 文献综述

### 1.1 前言

抗冻蛋白 (Antifreeze Proteins, AFPs) 最早于 1969 年在北极鱼类的血液被发现<sup>[1]</sup>, 又称为热滞蛋白 (Thermal Hysteresis Proteins, THPs)<sup>[2]</sup>, 是一类特殊的蛋白质, 能够结合在冰晶表面, 降低水的冰点, 抑制冰晶的生长和重结晶 (Recrystallization), 而对其熔点没有影响, 导致水溶液的冰点和熔点出现差值, 这种差值称为热滞活性 (Thermal Hysteresis Activity, THA)<sup>[3]</sup>。基于以上的特性, AFP 可以为生物体提供应对低温环境胁迫的保护作用, 是生物适应低温和冻害的一种高级生物学机制<sup>[4]</sup>。AFPs 在生物界中广泛存在, 从最早的极区鱼类, 到昆虫, 植物和微生物中都有发现<sup>[5-7]</sup>, 由于其特殊的功能, 在农业<sup>[8]</sup>、食品工业<sup>[9]</sup>、医学<sup>[10]</sup>和养殖业<sup>[11]</sup>等方面具有非常广阔的应用前景。

### 1.2 抗冻蛋白的特性

不同种类的抗冻蛋白各自的结构组成存在差异, 但都具有以下的几个功能特点: 热滞活性、修饰冰晶形态和抑制冰晶重结晶。

#### 1.2.1 热滞活性

AFPs 具有非依数性的热滞效应, 所谓非依数性指的是, 溶液的性质与溶质分子的数量无关, 只与溶质分子的种类有关。冰点温度与熔点温度之间的差异大小可以衡量 AFPs 抗冻活性的大小<sup>[12]</sup>, 差异越大, 表示 AFPs 的抗冻活性越大。一般的溶质, 例如 NaCl, 可以依数性的降低水溶液的冰点, 生理盐水的冰点为  $-0.539\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。单纯依靠这种作用, 不足以使生物体适应低温环境。AFPs 降低水溶液、体液或血清的效率要比依数性溶质高, 大约是 NaCl 的 200-500 倍<sup>[13]</sup>, AFPs 的这种特性对于低温环境下生物的存活具有重要的意义, 随着体液内普通溶质浓度的提高, 体液的热滞活性可以得到提升, 但是高浓度的体液带来的高渗透压往往对于生物体是有害的。而较低浓度的 AFPs 对渗透压的影响十分微弱, 可达到与普通溶质等同或更高的抗冻效果, 避免了高渗透压的毒害作用<sup>[14]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库