

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22320131151410

廈門大學

硕士学位论文

叶片山海绵硅蛋白 α 基因的克隆、原核表达以及重组蛋白的活性检测

Cloning and Prokaryotic Expression of the Silicatein- α Gene in *Mycale phyllophila* and Activity Assay of the Recombinant Silicatein- α

黄丹

指导教师姓名: 王德祥 副教授

专业名称: 海洋生物

论文提交日期: 2016 年 05 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

2016年05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

目录

缩略词表.....	i
摘要.....	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 海绵动物简介.....	1
1.1.1 海绵动物的生理特征与生殖发育.....	1
1.1.2 海绵动物的分布.....	2
1.1.3 海绵动物的系统分类.....	2
1.1.4 海绵动物的研究意义.....	3
1.2 海绵动物的骨骼系统.....	4
1.2.1 海绵动物的骨骼系统.....	4
1.2.2 海绵骨针的类型.....	4
1.2.3 海绵硅质骨针的形成过程.....	6
1.3 硅蛋白简介.....	7
1.3.1 硅蛋白的生物学特性.....	7
1.3.2 硅蛋白的生物化学特性.....	8
1.3.3 硅蛋白的酶促机制.....	10
1.3.4 硅蛋白的自组装.....	11
1.4 硅蛋白的应用.....	12
1.5 硅蛋白的异源表达研究进展.....	13
1.5.1 蛋白的异源表达.....	13
1.5.2 重组硅蛋白的异源表达.....	14
1.6 研究对象及研究意义.....	15
1.6.1 研究对象.....	15
1.6.2 研究意义.....	17
第二章 材料与amp;方法	19

2.1 实验材料与仪器.....	19
2.1.1 菌株和质粒.....	19
2.1.2 动物材料.....	19
2.1.3 主要化学试剂.....	19
2.1.4 主要仪器.....	21
2.1.5 主要溶液的配制.....	22
2.2 实验方法.....	25
2.2.1 样品采集.....	25
2.2.2 基因 MPSILCA α 的克隆.....	26
2.2.3 序列分析.....	32
2.2.4 原核表达载体的构建.....	33
2.2.5 重组蛋白 rSILIC α _MYCPH 的原核表达.....	35
2.2.6 诱导表达条件优化.....	37
2.2.7 目的蛋白的纯化.....	37
2.2.8 Bradford 法蛋白浓度测定标准曲线的制作.....	39
2.2.9 包涵体的纯化与复性.....	39
2.2.10 生成产物的显微观察.....	40
2.2.11 硅钼蓝分光光度法硅酸盐浓度测定标准曲线制作.....	41
2.2.12 复性 rSILIC α _MYCPH 的活性检测.....	42
2.2.13 复性 rSILIC α _MYCPH 活性反应条件探索.....	43
第三章 结果.....	45
3.1 基因 MPSILCA α 的克隆.....	45
3.2 MPSILCA α 的基因序列分析及 SILIC α _MYCPH 蛋白预测.....	46
3.2.1 MPSILCA α ORF 的序列特征.....	46
3.2.2 推导的 SILIC α _MYCPH 氨基酸序列分析.....	47
3.2.3 推导的 SILIC α _MYCPH 氨基酸序列的物理参数.....	49
3.2.4 SILIC α _MYCPH 的跨膜预测.....	49
3.2.5 SILIC α _MYCPH 的信号肽预测.....	50
3.2.6 SILIC α _MYCPH 的疏水性/亲水性预测.....	51
3.2.7 SILIC α _MYCPH 的可溶性预测.....	51
3.2.8 SILIC α _MYCPH 的二级结构预测.....	52

3.2.9 SILIC α _MYCPH 的三维结构预测	52
3.2.10 SILIC α _MYCPH 的系统进化分析	52
3.3 原核表达载体的构建	55
3.4 重组蛋白 rSILIC α _MYCPH 的原核表达	55
3.4.1 重组蛋白 rSILIC α _MYCPH 的小量诱导表达	55
3.4.2 重组质粒 pET-SILIC α _MYCPH 稳定性检测	56
3.4.3 表达产物的可溶性分析	56
3.5 诱导表达条件优化	57
3.5.1 诱导表达时间	57
3.5.2 IPTG 终浓度	58
3.5.3 诱导表达温度	58
3.5.4 低温低诱导剂浓度下表达	60
3.6 Bradford 法测定蛋白浓度	60
3.7 包涵体的纯化与复性	62
3.7.1 包涵体的溶解	62
3.7.2 包涵体的纯化	62
3.7.3 包涵体的复性	63
3.8 生成产物的显微观察	65
3.8.1 光学显微镜观察	65
3.8.2 扫描电子显微镜观察	65
3.9 复性 rSILIC α _MYCPH 活性检测	67
3.10 复性 rSILIC α _MYCPH 活性反应条件探索	69
第四章 讨论	75
4.1 MPSILCA α 基因的序列分析	75
4.2 重组蛋白 rSILIC α _MYCPH 的原核表达	76
4.3 包涵体的复性与复性 rSILIC α _MYCPH 的活性检测	78
第五章 研究总结与展望	82
5.1 研究总结	82
5.2 研究展望	83
参考文献	84

在学期间参与的科研项目及科研成果	97
参与的科研项目	97
科研成果	97
致谢	98

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abbreviations	i
Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Sponges	1
1.1.1 Physiological Characteristics and Reproductive Development.....	1
1.1.2 Distribution.....	2
1.1.3 Phylogenetic Systematics	2
1.1.4 Importance of Sponges	3
1.2 Skeletal System in Sponges	4
1.2.1 Skeletal System in Sponges.....	4
1.2.2 Spicules Types	4
1.2.3 Formation of Siliceous Spicules	6
1.3 Silicatein	7
1.3.1 Biological Property of Silicatein	7
1.3.2 Biochemical Property of Silicatein.....	8
1.3.3 Catalytic Mechanism of Silicatein.....	10
1.3.4 Silicatein Self-assembly	11
1.4 Applications of Silicatein	12
1.5 Heterologous Expression of Silicatein	13
1.5.1 Heterologous Expression of Proteins	13
1.5.2 Heterologous Expression of Recombinant Silicatein	14
1.6 Research Object and Research Significance	15
1.6.1 Research Object.....	15
1.6.2 Research Significance.....	17
Chapter 2 Materials and Methods	19

2.1 Materials and Instruments	19
2.1.1 Bacterial Strains and Expression Vector	19
2.1.2 Animal Materials	19
2.1.3 Main Chemical Reagents	19
2.1.4 Main Instruments	21
2.1.5 Main Solution Preparation	22
2.2 Methods	25
2.2.1 Sampling	25
2.2.2 Cloning of MPSILCA α Gene	26
2.2.3 Sequence Analysis	32
2.2.4 Construction of the Prokaryotic Expression Vector	33
2.2.5 Prokaryotic Expression of rSILIC α _MYCPH	35
2.2.6 Expression Conditions Optimization	37
2.2.7 Purification of Interest Proteins	37
2.2.8 Standard Curve of Bradford Protein Measuring	39
2.2.9 Purification and Renaturation of the Inclusion Bodies	39
2.2.10 Product Microexamination	40
2.2.11 Standard Curve of Silicon-Molybdenum Blue Spectrophotometer Silicate Measuring	41
2.2.12 Refolded rSILIC α _MYCPH Activity Assay	42
2.2.13 Study of the Activity Assay Reaction Conditions	43
Chapter 3 Results	45
3.1 Cloning of the Gene MPSILCAα	45
3.2 Sequence Analysis of MPSILCAα and Protein Prediction of SILICα_MYCPH	46
3.2.1 Sequence Signature of MPSILCA α ORF	46
3.2.2 Amino Acid Analysis of SILIC α _MYCPH	47
3.2.3 Physical Parameter of SILIC α _MYCPH Amino Acid Sequence	49
3.2.4 Transmembrane Segment Prediction of SILIC α _MYCPH	49
3.2.5 Signal Peptide Prediction of SILIC α _MYCPH	50
3.2.6 Hydrophobicity/Hydrophily Prediction of SILIC α _MYCPH	51
3.2.7 Solubility Prediction of SILIC α _MYCPH	51

3.2.8 Secondary Structure Prediction of SILIC α _MYCPH.....	52
3.2.9 Three-dimensional Structure Prediction of SILIC α _MYCPH	52
3.2.10 Phylogenetic Analysis of SILIC α _MYCPH.....	52
3.3 Construction of the Prokaryotic Expression Vector.....	55
3.4 Prokaryotic Expression of rSILICα_MYCPH	55
3.4.1 Inducible Expression of rSILIC α _MYCPH	55
3.4.2 Stability Testes of the Recombinant Vector pET- SILIC α _MYCPH.....	56
3.4.3 Solubility Analysis of the Expressed Products.....	56
3.5 Expression Conditions Optimization.....	57
3.5.1 Induced Time Length.....	57
3.5.2 IPTG Concentration.....	58
3.5.3 Induced Temperature	58
3.5.4 Expression under Low Temperature and Low IPTG Concentration.....	60
3.6 Bradford Protein Measuring.....	61
3.7 Purification and Renaturation of the Inclusion Bodies	62
3.7.1 Dissolution of the Inclusion Bodies.....	62
3.7.2 Purification of the Inclusion Bodies	62
3.7.3 Renaturation of the Inclusion Bodies	63
3.8 Product Microexamination.....	65
3.8.1 Optical Microscopy	65
3.8.2 Scanning Electron Microscopy.....	65
3.9 Refolded rSILICα_MYCPH Activity Assay	67
3.10 Study of the Activity Assay Reaction Conditions.....	70
Chapter 4 Discussion	75
4.1 Sequence Analysis of the Gene MPSILCA α	75
4.2 Prokaryotic Expression of rSILIC α _MYCPH	76
4.3 Inclusion Body Renaturation and Refolded rSILIC α _MYCPH Activity Assay.....	78
Chapter 5 Conclusions and Research Prospects.....	82
5.1 Conclusions	82
5.2 Research Prospects.....	83

References	84
Science Projects and Achievements	97
Science Projects	97
Achievements	97
Acknowledgements	98

厦门大学博硕士论文摘要库

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
BLAST	basic local alignment search tool	基本局域联配搜索工具
bp	base pair	碱基对
BSA	albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
dd H ₂ O	double-distilled water	双蒸水
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTPs	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
kDa	kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
MEGA	molecular evolutionary genetics analysis	分子进化分析软件
MPSILCA α	silicatein α gene of <i>Mycale phillophila</i>	叶片山海绵硅蛋白 α 基因
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国立生物信息中心
N-J	neighbor-joining	邻位相接法
ORF	open reading frame	开放阅读框
PAGE	polyacrylamide gelelectrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RT	reverse transcription	反转录
rpm	revolutions per minute	每分钟转速
rSILIC α _MYCPH	recombinant silicatein α of <i>M. phillophila</i>	重组叶片山海绵硅蛋白 α
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	SDS- polyacrylamide gelelectrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SILIC α _MYCPH	silicatein α of <i>M. phillophila</i>	叶片山海绵硅蛋白 α

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TEOS	tetraethyl orthosilicate	四乙氧基硅烷
YT	yeast extract-trytone medium	酵母蛋白胨培养基

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

海绵动物是古老的多细胞动物，其骨架中最重要的组成成分是硅质骨针。与硅质骨针形成密切相关的酶被称为硅蛋白(silicatein)，属于类木瓜蛋白酶半胱氨酸蛋白酶亚家族，具有由丝氨酸(Ser)、天冬酰胺(Asn)和组氨酸(His)组成的催化三分子和特征性的羟基氨基酸簇，主要作用是参与海绵动物硅质骨针的形成，其在离体条件下对于生物硅沉淀的催化作用在仿生学应用上具有重要的应用价值。

研究对象叶片山海绵(*Mycale phyllophila*, Hentschel 1911)隶属多孔动物门(Porifera)、寻常海绵纲(Demospongiae)、繁骨海绵目(Poecilosclerida)、山海绵科(Mycalidae)、山海绵属(*Mycale*)，是福建海域常见的海绵种类。为了能够获得有活性的重组叶片山海绵硅蛋白 α (重组蛋白命名为 rSILIC α _MYCPH，基因命名为 MPSILCA α)，本研究采用 RT-PCR 技术成功获得了基因 MPSILCA α ，成功构建了原核表达载体并表达了重组蛋白 rSILIC α _MYCPH。由于大部分重组蛋白以包涵体的形式存在，本研究尝试对包涵体进行复性，获得了有活性的 rSILIC α _MYCPH，并率先开展了其体外活性影响条件的探索。

对于基因和氨基酸序列的分析结果表明，MPSILCA α 的开放阅读框为 993 bp，编码 330 个氨基酸残基，其中带有硅蛋白典型的催化三分子和羟基氨基酸簇。推导的 SILIC α _MYCPH 氨基酸序列具有 2 个结构域，分别是 Inhibitor I29 和 Peptidase C1A。序列相似性分析结果显示，其氨基酸序列与同目的寇海绵 *Latrunculia oparinae* 的硅蛋白 A2 (ACH48000.1) 相似度最高、同源性最近，为 77%。

原核表达实验中，本研究进行了诱导时间、IPTG 终浓度、诱导温度三方面的优化，最终在温度为 16°C、IPTG 浓度 0.01 mmol/L、诱导时间为 24 h 的条件下，获得了可溶性蛋白，但浓度较低，最高仅为 17 $\mu\text{g/mL}$ ，因此本研究还进行了包涵体的复性。对表达所得的目的蛋白包涵体在谷胱甘肽氧化还原体系中复性，结合 PEG 4000 的添加以及透析，获得了复性的 rSILIC α _MYCPH，并进行了体外活性实验。活性反应产物在光学显微镜下观察，在实验组中发现了与对照组不同的不定形物质。活性反应产物在扫描电子显微镜下观察，实验组在烘干后形成了一些形状比较规则的物质，通过 EDS 能谱可知，该产物为二氧化硅，说明所

复性的 rSILIC α _MYCPH 具有体外催化不定形二氧化硅生成的活性。

在活性条件探索的实验中，温度对 rSILIC α _MYCPH 的活性极显著的影响($p < 0.01$)，其中 25°C 时活性最高，15°C 活性次之，35°C、45°C 活性相对较低，由此可知 rSILIC α _MYCPH 的活性反应在较低温度下进行比较合适。不同的 pH 对 rSILIC α _MYCPH 的活性也有着极显著的影响($p < 0.01$)，其中 pH 5 的弱酸性对反应有一定程度上的促进作用，中性的 pH 7 条件次之，pH 1、pH 3 和 pH 9 都表现出了抑制作用。重组蛋白 rSILIC α _MYCPH 的浓度对其活性有显著的影响($p < 0.05$)，随着添加浓度的上升，其催化作用也越强烈。在添加不同浓度胶原蛋白的试验中，rSILIC α _MYCPH 的活性随着胶原蛋白的浓度的上升而上升，胶原蛋白对其活性有极显著的促进作用($p < 0.01$)。

综上所述，本研究发现 rSILIC α _MYCPH 的原核表达与表达时间、表达温度和诱导剂 IPTG 浓度都有着密切的关系，尤其是可溶性蛋白的表达，更需要对表达条件进行优化。然而，想要获得更高浓度的可溶性蛋白，仍然需要从基因的层面入手来进行优化。本研究对活性反应条件探索发现，rSILIC α _MYCPH 的活性与反应温度、pH、蛋白浓度和添加的胶原蛋白浓度有关，说明硅蛋白作为体外二氧化硅合成的主效应，其活性受多种因素的影响。由胶原蛋白对活性的促进作用可以推测，其他与骨针形成相关的蛋白也可能是硅蛋白活性的促进剂。

关键词：多孔动物门；叶片山海绵；海绵硅蛋白 α ；原核表达；活性检测

Abstract

As the most primary multicellular organisms on earth, sponges possess the most novel skeletal elements, siliceous spicules. An enzyme named silicatein, which is considered to be a new member of the papain-like cysteine protease subfamily, is closely related to the formation of siliceous spicules. Silicatein is distinguished by a Ser-Asn-His catalytic triad and characteristic serine cluster, which plays an important role in the catalyzation of amorphous silica condensation. The feature of catalyzing biosilicification under ambient environment makes silicatein a valuable research object in applications of bionics.

The research model organism is the demosponge *Mycale phyllophila*, Hentschel 1911 (Porifera, Demospongiae, Poecilosclerida, Mycalidae), which is a common species along Fujian coastal areas. In order to obtain active recombinant silicatein α (rSILIC α _MYCPH) from *M. phyllophila*, we cloned the silicatein α gene termed MPSILCA α by using RT-PCR, constructed the specific prokaryotic vector by choosing the vector pET-32a(+) and the bacterial strain *Escherichia coli*, and expressed rSILIC α _MYCPH successfully. However, most of the interest protein were expressed in the form of inclusion bodies, so we tried to refold the denatured protein from the inclusion bodies. The results suggested that the used refolding method was suitable for rSILIC α _MYCPH, and we obtained certain amount of active silicatein α . After insuring the activity of rSILIC α _MYCPH, we studied several conditions in order to find those suited the activity assay the most, which was the first activity assay conditions trial on silicatein.

The results of gene and amino sequence analysis indicates that the open reading frame of MPSILCA α was 993 bp, which encoded 330 amino acids. The deduced protein contained the classic silicatein catalytic triad and serine cluster, as well as two structure domains, Inhibitor I29 and Peptidase C1A. Sequence identity analysis showed that the amino acid sequence was the most similar and the most homologous to the silicatein A2 (ACH48000.1) of the sponge *Latrunculia oparinae*, which belongs to the same

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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 for delivery details.