

# 二种多管水母光蛋白基因的分离、表达及生物活性初步研究

罗文新<sup>1</sup>, 张 军<sup>1</sup>, 李少伟<sup>1</sup>, 程 通<sup>1</sup>, 陈 敏<sup>1</sup>, 李少菁<sup>1</sup>, 夏宁邵<sup>1</sup>

(1. 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 分别从厦门东海域的大型多管水母和细小多管水母中分离到了新的光蛋白基因 *aeqxm* 和 *aeqxsm*, 并在大肠杆菌中进行了表达. *aeqxm* 和 *aeqxsm* DNA 序列的编码区总长均为 585 bp, 无内含子序列, 推导的氨基酸序列总长均为 195 个氨基酸. *aeqxm*, *aeqxsm* DNA 和 AEVAQ440X cDNA 之间的核苷酸序列同源性分别为 80.7%, 85.1%, *aeqxm* 和 *aeqxsm* DNA 的核苷酸序列同源性为 87.2%. 原光蛋白 *apoeqxm*, *apoeqxsm* 与 AEVAQ440X 编码的氨基酸序列之间的同源性分别为 84.7%, 84.2%, *apoeqxm* 和 *apoeqxsm* 的氨基酸序列之间的同源性为 94.4%. 分别将 *aeqxm* 和 *aeqxsm* 基因克隆至 pTO-T7 表达载体, *apoeqxm*, *apoeqxsm* 在大肠杆菌中的表达量都达到 40% 左右. 取菌体超声上清与腔肠动物荧光素 f、巯基乙醇混合再生后, 加入  $\text{CaCl}_2$ , 用荧光全谱仪检测到 470 nm 处的瞬时发光, 表明表达的 *apoeqxm*, *apoeqxsm* 具有正常的生物学功能.

**关键词:** 大型多管水母; 细小多管水母; 光蛋白基因; 表达

中图分类号: Q959.131<sup>+</sup>.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2004)04-0110-08

## 1 引言

水母光蛋白 (aequorin) 是一种生物发光蛋白, 分离自发光水母, 由 22 KD 的原光蛋白 (apoequorin)、分子氧和腔肠动物荧光素 (coelenterazine) 组成. 当 3 个  $\text{Ca}^{2+}$  与之结合时 coelenterazine 即氧化为 coelenteramide, 并释放出  $\text{CO}_2$  发射蓝光. 光蛋白对  $\text{Ca}^{2+}$  具有高度敏感性和

收稿日期: 2001-04-16; 修订日期: 2001-08-13.

基金项目: 国家海洋“863”高科技计划领域青年基金资助项目(819-Q-06); 国家自然科学基金资助项目(C01040101); 福建省自然科学基金资助项目(C0010001).

作者简介: 罗文新(1970—), 女, 湖南省湘潭市人, 助理研究员, 从事海洋生物研究. E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

特异性而被用作  $\text{Ca}^{2+}$  的生物学指示剂,已被成功地应用于哺乳动物、植物、酵母、大肠杆菌细胞,检测很多重要的生理学和病理学反应<sup>[1~4]</sup>. 光蛋白亦可用作细胞内基因表达、发光免疫检测的良好标记,应用于定量 PCR,用化学发光检测目的 DNA 和内参<sup>[5~8]</sup>.

1985 年 Inouye 等<sup>[9,10]</sup>首先从维多利亚多管水母分离出原光蛋白的 cDNA —AQ440 (即 AEVAQ440X), Charbonneau 等<sup>[11]</sup>通过蛋白测序确定了其初级结构,成熟的原光蛋白由 189 个氨基酸组成,有 3 个 EF hand 结构是  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点. 同年 Prasher 等<sup>[12]</sup>从维多利亚多管水母克隆到原光蛋白的 cDNA,并在大肠杆菌中得到表达,其序列与 Inouye 分离的原光蛋白 cDNA 有很大不同,存在 52 个核苷酸差异. 在 genbank 中登录的光蛋白序列共有 9 条,其中 6 条均来自维多利亚多管水母,1 条来自不知名的水母,2 条为人工突变序列. 来自维多利亚多管水母的 6 条光蛋白的核苷酸序列同源性在 90% 以上. 而国内还未见到这方面的报道.

本研究报道从大型多管水母 (*Aequorea macrodactyla*) 和细小多管水母 (*Aequorea parva*) 中分离到两种新的光蛋白基因,并在大肠杆菌中进行表达,表达出来的两种原光蛋白都具有生物学活性.

## 2 材料和方法

### 2.1 大型多管水母和细小多管水母

自厦门东海域定置网中捕捞大型多管水母和细小多管水母.

### 2.2 菌株和质粒

大肠杆菌 JM101, BL21 (DE3) 株为本室保存,质粒 pTO - T7 由本室构建保存, pMD 18-T 载体购自 Takara 公司.

### 2.3 酶及其他生化试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司, NB T/BCIP, DNA 柱式胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司, PCR DIG Labeling mix 购自德国 Boehringer Mannheim GmbH 公司, PCR 用 Taq 酶、dNTP 购自上海生工生物工程公司, FITC 购自美国 Promega 公司, coelenterate f 购自 Molecular Probes 公司.

### 2.4 PCR 引物

PRC 引物由上海博亚生物技术公司合成 (表 1).

### 2.5 水母 DNA 的提取

取  $2 \text{ cm}^3$  水母伞缘组织于匀浆器中,加入  $4 \text{ cm}^3$  DNA 提取液,匀浆后用等体积酚抽提,以  $12\ 000 \text{ r/min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 吸取上

清液,加入  $5 \text{ mm}^3$  RNase A ( $10 \text{ mg/cm}^3$ ), 静置  $2 \text{ h}$  加入等体积氯仿,以  $12\ 000 \text{ r/min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 吸取上清液,加入乙酸铵 (终浓度为  $0.3 \text{ mol/dm}^3$ ) 和 2 倍体积无水乙醇,混匀即可看到丝状 DNA,以  $12\ 000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ , 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次,烘干后溶于 TE 中.

### 2.6 探针制备

根据 AEVAQ440X 的序列设计特异性引物 aqF448, aqR712, 以细小多管水母的 DNA 为模

表 1 PCR 引物的名称和序列

引物名称	序 列
aqF448	5 - ATC CGT ATA TGG GGT GAT GC - 3
aqR712	5 - GAG CTT CTT AGG GGA CAG CT - 3
aqF93	5 - GTC TCG ACA ACA AGC AAA C - 3
aqF1	5 - CTG CAG TGA ATT CAT GAC CAG CA ATA CGC - 3
aqR1	5 - CTC GAG TTA GGG GAC AGC TCC - 3

板,在不同条件下进行 PCR 扩增,结果在如下的条件下获得了一条特异的 260 bp 左右 DNA 片段,94 5 min,94 55 s,51 55 s,72 55 s,35 个循环,72 10 min. 测序结果证明此片段为 264 bp,与 AEVAQ440X cDNA 之间的核苷酸序列同源性为 87.5%. 以 aqF448, aqR712 为引物,此 264 bp 片段为模板,dNTP 为地高辛标记的 dNTP Mix,经 PCR 扩增出 264 bp 片段作为 Southern 杂交探针.

PCR 地高辛标记基因探针的制备、Southern 杂交、表达载体的构建等按常规分子生物学方法操作<sup>[13]</sup>.

## 2.7 原光蛋白在大肠杆菌中的表达

用 E. coli BL21 作表达菌株,挑单菌落于 200 cm<sup>3</sup> LB (含 Kan100 μg/cm<sup>3</sup>) 培养基中,37 振荡培养过夜,菌液 OD<sub>600</sub> 值达 0.8 左右,0.2 mmol/dm<sup>3</sup> 的 IPTG 诱导,25 表达 6 h 后收获菌体,超声破碎,以 15 000 r/min 离心 10 min,沉淀溶于与上清等体积的 20 mmol/dm<sup>3</sup> Tris-HCl (pH 7.6) 中取等量上清和沉淀溶液进行 SDS-PAGE 电泳. 堆积胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%. 蛋白质 SDS-PAGE 结果用扫描仪在波长为 560 nm 处扫描分析.

## 2.8 光蛋白生物功能测定

取 1 cm<sup>3</sup> 表达菌体超声上清,加入 6 mm<sup>3</sup> coelenterate f (1 μg/mm<sup>3</sup>,甲醇溶液) 和 10 mm<sup>3</sup> 巯基乙醇 (2-mercaptoethanol), 混匀即为再生混合物,置于冰浴 3 h,加入 2.0 cm<sup>3</sup> 30 mmol CaCl<sub>2</sub> 除以 30 mmol Tris-HCl pH7.6,用荧光全谱仪检测其荧光强度及荧光性质.

## 2.9 DNA 序列分析

DNA 序列开放阅读框架的分析用 dnasis 程序,蛋白质序列同源性比较用 DNASTAR 程序.

## 2.10 GenBank 登录号

AEVAQ440X L29571, aeqxm A Y013823, aeqxm A Y013822.

```

1 ATGACCAGCAAAATACGCCGTCAAACCTTGAGCCAGACTTTGAGAACC AAAATGGGTTGGT
M T S K Y A V K L E P D F E N P K W V G
61 CGACACAAGCATATGTTCAAATTCCTTGATGTCAATCAAATGGAAGATCTCTCTTGAC
R H K H M F K F L D V N Q N G K I S L D
121 GAGATGGTCTACAAGGCGTCCGACATTGTCAACAACATCTTGGGGCGACACCCGAACAA
E M V Y K A S D I V I N N L G A T P E Q
181 GCTAAACGACACAAGGACGCCGTAGAGGCTTCTTCGGAGGCCCGGAATGAAATACGGC
A K R H K D A V E A P F G C A G M K Y G
241 GTGGAAACTGAATGGCCTGAATACATCGAAGGATGGAAGAATTTGGCGAGAACGGAATTA
V B T E W P E Y I B G W K N L A R T E L
301 GACAGATTTGCAAGAATCAAATAACCGCTCATTGGCTTGTGGGGCGATCGCTTGTTTGAC
D R F A K K Q I T L I R L W G D A L F D
361 ATCATTGACAAAGATCAAAATGGTGTATCACTTGGACGAATGGAAGAAATACACACTG
I I D K D Q N G A I T L D E W K K Y T L
421 TCAGCTGGCATCATTCACTCAGCAGCAAGATGCCAGATAACGTTCAACGATATGTGATTTG
S A G I I Q S A B D C E I T P K Y C D L
481 GACGACAGTGGAAAGACTTGATGCGGACGAAAATGACACGACAACACATCGGATTTGGTAC
D D S G R L D A D B M T R Q H I G F W Y
541 ACCATGGATCCGGCGTGGCAAAAGCTCTACGGAGGAGCTGTCGCCCTAA
T M D P A C E E L Y G G A V P *

```

## 3 结果

### 3.1 aeqxm 基因的分离

用低复性温度 PCR 和 Southern 杂交鉴定相结合的方法,来分离大型多管水母的光蛋白基因. 根据已知的 AEVAQ440X 基因序列,设计合成了 6 条特异性引物,将 3 条上游引物和 3 条下游引物进行多种组合形成多种引物对,以大型多管水母的 DNA 为模板,在不同条件下进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行 Southern 杂交,杂交结果为阳性者进行测序. 结果在 aqF93 和 aqR712 两条引物的 PCR 产物中筛选出了 1 个 Southern 杂交阳性片段. PCR 反应条件为:94 预变

图 1 aeqxm 基因的 DNA 序列及推测的氨基酸序列

性 15 min, 94 60 s, 46 90 s, 72 60 s, 35 个循环, 72 延伸 10 min.

将此片段克隆至 pMD-18 T 载体, 得到质粒 pTAXm, 经斑点杂交鉴定为阳性. 测序结果表明, 这个片段即为新分离的 aeqxm 基因. 因此得到了来自大型多管水母的光蛋白基因的 DNA 序列. aeqxm DNA 序列无内含子, 编码区总长为 585 bp, 编码 195 个氨基酸 (见图 1), Genbank 登录号为 A Y013823. aeqxm 与 AEVAQ440X 之间的核苷酸序列同源性为 80.7%.

### 3.2 aeqxxm 基因的分离

根据 aeqxm 基因的序列设计特异性引物 aqF1 和 aqR1, 用相同的方法来分离细小多管水母的 aeqxxm 基因. 以细小多管水母的 DNA 为模板, 在各种不同条件下进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物经 Southern 杂交分析, 结果扩增到了 1 条阳性片段. PCR 反应条件为: 94 预变性 15 min, 94 50 s, 57 40 s, 72 45 s, 35 个循环, 72 延伸 10 min.

将此片段克隆至 pMD-18 T 载体, 得到质粒 pTAXxm, 经斑点杂交鉴定为阳性. 测序结果表明, 这个片段即为新分离的细小多管水母光蛋白基因. aeqxxm DNA 序列同样无内含子, 编码区总长为 585 bp, 编码 195 个氨基酸 (图 2), Genbank 登录号为 A Y013822. aeqxxm 与 AEVAQ440X, aeqxm 间的核苷酸序列同源性分别为 85.1%, 87.2%.

3.3 aeqxm, aeqxxm 推测的氨基酸序列的分析

AEVAQ440X 编码 196 个氨基酸, 而 aeqxm, aeqxxm 都只编码 195 个氨基酸, 在第 5 位少了一个 Gln, 原光蛋白 apoaeqxm, apoaeqxxm 与 AEVAQ440X 之间的氨基酸序列同源性分别为 84.7% 和 87.2%, 而 apoaeqxm 和 apoaeqxxm 之间的氨基酸序列同源性高达 94.4% (见图 3).

因为直接从水母中提取的天然光蛋白只有 189 个氨基酸, 没有前面的第 1~7 个氨基酸, Inouye 等将 AEVAQ440X 编码的第 8 个氨基酸 Val 定为此蛋白的第 1 个氨基酸, 并认为 AEVAQ440X 的 3 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点在 24~35, 117~128, 153~164 位氨基酸残基. 由此推测光蛋白 aeqxm 和 aeqxxm 的 3 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点在 30~41, 123~134, 159~170 位氨基酸残基. 其中第 2 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点的氨基酸组成与 AEVAQ440X 完全相同, 在第 1 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点存在一个氨基酸差异, 而在第 3 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点的氨基酸差异达到 4 个之多.

### 3.4 原光蛋白 apoaeqxm 和 apoaeqxxm 的表达

用 EcoRI/XhoI 双酶切, 从 pTAXm, pTAXxm 质粒中切出 aeqxm, aeqxxm DNA 片段, 分别插入相同酶切的 pTO-T7 表达载体<sup>[14]</sup>, 得到表达质粒 pTO-T7AXm, pTO-T7AXxm (见图 4). 分别将两个表达质粒转化至 BL21 菌株中, 挑单菌落进行表达. 蛋白质 SDS-PAGE 结果表明, 表达的原光蛋白 apoaeqxm, apoaeqxxm 都达到菌体总蛋白量的 40% 左右, 其中 70% 左右蛋

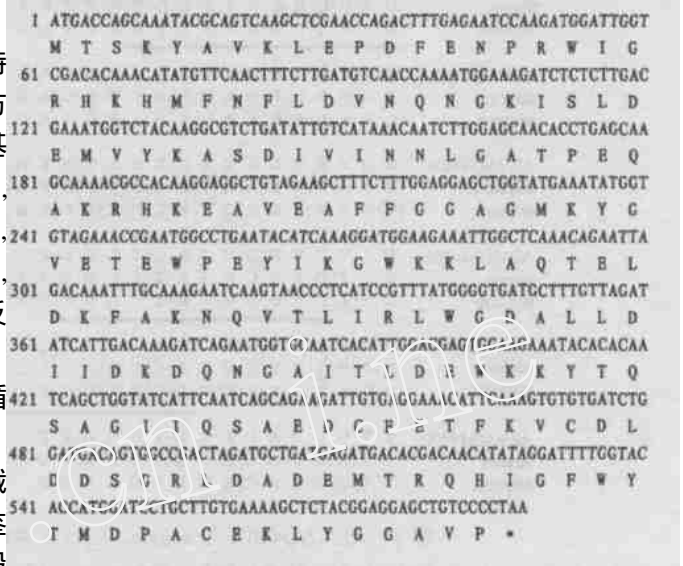


图 2 aeqxxm 基因的 DNA 序列及推测的氨基酸序列

白都以可溶性形式存在(图5).

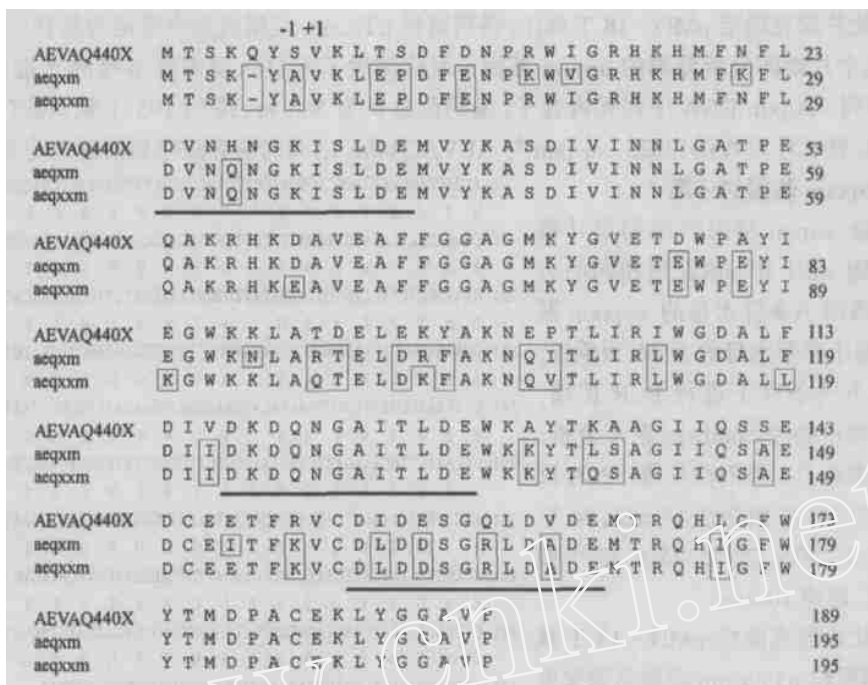


图3 AEVAQ440X与aeqxm,aeqxcm编码的氨基酸序列的比较  
下划线处为Ca<sup>2+</sup>结合位点,AEVAQ440X以第8位的V为第1个氨基酸.  
框内为与AEVAQ440X不同的氨基酸

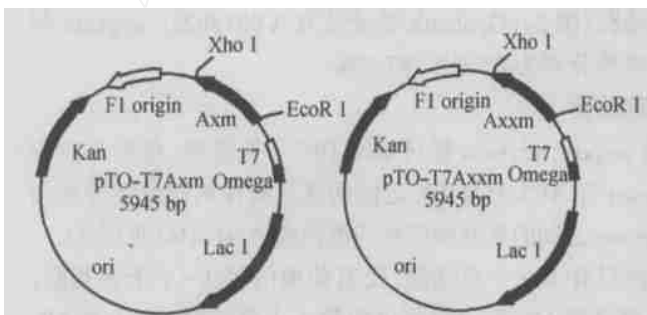


图4 pTO-T7Axm,pTO-TAxxm的质粒

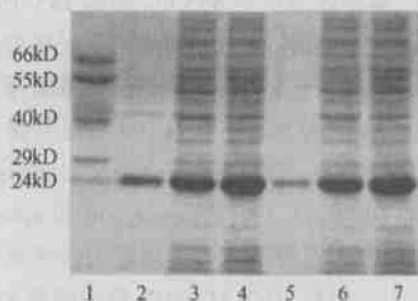


图5 原光蛋白apoaeqxm和apoaeqxcm在大肠杆菌中的表达

1. 分子量 marker, 2. 沉淀中的apoaeqxcm,
3. 上清中的apoaeqxcm, 4. apoaeqxcm的表达,
5. 沉淀中的apoaeqxcm, 6. 上清中的apoaeqxcm,
7. apoaeqxcm的表达

### 3.5 原光蛋白apoaeqxm和apoaeqxcm的生物活性测定

表达蛋白的生物功能测定参照 Shimomura 等<sup>[15]</sup>的方法. 分别将 1 cm<sup>3</sup> pTO - T7Axm, pTO - T7Axxm 表达的菌体超声上清与腔肠动物荧光素 f, 巯基乙醇混匀冰浴 3 h 后, 加入 2.0 cm<sup>3</sup> 30 mmol CaCl<sub>2</sub>/ 30 Mm Tris-HCl pH 7.6, 用荧光全谱仪检测到在 470 nm 处的瞬发

光,说明表达的两种光蛋白具有正常的生物学功能。

光蛋白 *aeqxm* 和 *aeqxxm* 的活性均随着再生时间的增加而升高,并在 3 h 后达到最高值,此时 *aeqxm* 的活性是 *aeqxxm* 活性的 2 倍(数据未显示)。当再生混合物冰浴 30 min 后,*aeqxm* 已显示出较好的活性。当 NaCl 浓度为 0, pH 值为 7.6, 温度在 30 以下,*aeqxm* 的活性达到最大值。当 NaCl 浓度为 0, pH 值为 7.6~8.5, 温度在 30 以下,*aeqxxm* 的活性达到最大值。

## 4 讨论

本研究采用 PCR 扩增和 Southern 杂交筛选相结合的方法,从厦门东海域的大型多管水母和细小多管水母中分离到了两种新的光蛋白基因 *aeqxm*, *aeqxxm* 的全长 DNA 序列,并在大肠杆菌中表达了具有生物学活性的新的原光蛋白—*apoeqxm*, *apoeqxxm*。

已知的原光蛋白的核酸序列都是 cDNA 序列,未见相应的 DNA 序列报道,维多利亚多管水母 AEVAQ440X cDNA 序列中编码区的长度为 588 bp。而所分离的光蛋白基因 *aeqxm*, *aeqxxm* 的核苷酸序列都是来自发光水母的基因组 DNA,编码区的长度为 585 bp,其中不存在内含子序列。*aeqxm*, *aeqxxm* DNA 与 AEVAQ440X cDNA 之间的核苷酸序列同源性分别为 80.7% 和 85.1%。*aeqxm* 和 *aeqxxm* DNA 之间的核苷酸序列同源性为 87.2%。AEVAQ440X 编码 196 个氨基酸,而 *aeqxm*, *aeqxxm* 都只编码 195 个氨基酸,在第 5 位少了一个 Gln, *apoeqxm*, *apoeqxxm* 与 AEVAQ440X 之间的氨基酸序列同源性分别为 84.7% 和 87.2%,而 *apoeqxm* 和 *apoeqxxm* 之间的氨基酸序列同源性达到 94.4%。

Cormier 等<sup>[16]</sup>在二维琼脂糖电泳中观察到,从水母组织中提取的光蛋白有 5 个同种异型。光蛋白 DNA 的 Southern blot 分析表明,至少存在 4 种光蛋白基因,而在 Genebank 中登录的 6 条光蛋白基因是来自维多利亚多管水母,因此可能在维多利亚多管水母中存在一个光蛋白多基因家族。本研究从厦门东海域的大型多管水母和细小多管水母中各分离到 1 条光蛋白基因,这两种水母是否亦存在光蛋白多基因家族还需进一步研究。*aeqxm*, *aeqxxm* 光蛋白基因的获得和表达,将促进同类光蛋白的遗传序列和蛋白结构的同源性研究,进一步提供光蛋白的进化方面的信息,并寻找出同类基因和蛋白结构的基本保守成分。

为了促进光蛋白的广泛应用,人们试图通过对来自维多利亚多管水母的光蛋白基因进行突变而获得多种变异型,包括生物活性提高的类型。目前已通过 C-端一系列缺失、代替、增加的突变对其进行了发光活性研究,亦通过其核酸和氨基酸序列的定点突变而增强其生物发光活性,此外,重组光蛋白和重组半合成光蛋白的出现使其更适应于细胞内  $Ca^{2+}$  监测<sup>[17~19]</sup>。

Kurose 等<sup>[19]</sup>利用定点突变的方法,将 3 个半胱氨酸残基替换成丝氨酸,发现只有当 3 个半胱氨酸残基替换成丝氨酸时,光蛋白的发光活性相当或超过野生型。Prasher 同样采用基因突变的方法,发现在第 2 个  $Ca^{2+}$  结合位中,将第 124 位的天冬氨酸突变成丝氨酸,或者第 129 位的甘氨酸突变成丙氨酸,或者第 135 位的谷氨酸突变成丝氨酸,光蛋白的生物发光活性增强(美国专利号 5360728, 1994 年)。*aeqxm* 和 *aeqxxm* 编码的氨基酸序列在以上位点都与 AEVAQ440X 相同,因此推测可以通过同样的突变而提高这两种光蛋白的生物发光活性。

本研究获得的两种光蛋白 *aeqxm* 和 *aeqxxm* 具有正常的生物学活性,两种新的光蛋白基因的获得及在大肠杆菌中的大量表达将为光蛋白改造提供丰富的资源,使光蛋白的应用更为广泛和深入。光蛋白家族的扩大,有利于更好地完成作为分子标记和指示剂等的一系列生物

学研究.

国家海洋局第三研究所张金标研究员帮助分类鉴定多管水母,特此致谢!

参考文献:

- [1] SALA-NEWBY G B, TAYLOR K M, BADMINTON M N, et al. Imaging bioluminescent indicators show  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP permeability thresholds in live cells attacked by complement [J]. *Immunology*, 1998, 93: 601—609.
- [2] HAMPTON T G, AMENDE I, TRAVERS K E, et al. Intracellular calcium dynamics in mouse model of myocardial stunning [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274: H1821—7.
- [3] CESSNA S G, CHANDRA S, LOW P S. Hypo-osmotic shock of tobacco cells stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes deriving first from external and then internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 27 286—27 291.
- [4] LEUNG C F, WEBB S E, MILLER A L. Calcium transients accompany ooplasmic segregation in zebrafish embryos [J]. *Dev Growth Differ*, 1998, 40: 313—326.
- [5] CASADEI J, POWELL M J, KENTEN J H. Expression and secretion of aequorin as a chimeric antibody by means of a mammalian expression vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2 047—2 051.
- [6] ZENNO S, INOU YE S. Bioluminescent immunoassay using a fusion protein of protein A and the photoprotein aequorin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 171: 169—174.
- [7] VERHAEGEN M, CHRISTOPOULOS T K. Quantitative polymerase chain reaction based on a dual-analyte chemiluminescence hybridization assay for target DNA and internal standard [J]. *Anal Chem*, 1998, 70: 4 120—4 125.
- [8] ACTOR J K, KUFFNER T, DEZZUTTI C S, et al. A flash-type bioluminescent immunoassay that is more sensitive than radioimaging: quantitative detection of cytokine cDNA in activated and resting human cells [J]. *J Immunol Methods*, 1998, 211: 65—77.
- [9] INOU YE S, NOGUCHI M, SAKAKI Y, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 3 154—3 158.
- [10] INOU YE S, SAKAKI Y, GOTO T, et al. Expression of apoequorin complementary DNA in *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1986, 25: 8 425—8 429.
- [11] CHARBONNEAU H, WALSH K A, MCCANN R O, et al. Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin [J]. *American Chemical Society*, 1985, 24: 6 762—6 771.
- [12] PRASHER D, MCCANN R O, CORMIER M J. Cloning and expression of the cDNA cloning for aequorin: a bioluminescent calcium-binding protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 126(3): 1 295—1 268.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆操作指南(第二版) [M]. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [14] 罗文新, 张 军, 夏宁邵, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 578—581.
- [15] SHIMOMURA O, JOHNSON F H. Regeneration of the photoprotein aequorin [J]. *Nature*, 1975, 17; 256(5514): 236—238.
- [16] CORMIER M J, PRASHER D C, LONGIARU M, et al. The enzymology and molecular biology of the  $\text{Ca}^{2+}$  activated photoprotein, aequorin [J]. *Photochem Photobiol*, 1989, 49: 59—512.
- [17] NOMURA M, INOU YE S, OHMIYA Y, et al. A C-terminal proline is required for bioluminescence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding photoprotein, aequorin [J]. *FEBS Lett*, 1991, 295: 63—66.
- [18] SHIMOMURA O, INOU YE S, MUSICKI B, et al. Recombinant aequorin and recombinant semi-synthetic aequorins: cellular  $\text{Ca}^{2+}$  ion indicators [J]. *Biochem J*, 1990, 270: 309—312.
- [19] KUROSE K, INOU YE S, SAKAKI Y, et al. Bioluminescence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding photoprotein aequorin after cysteine modification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 80—84.

## Cloning and expression of the aequorin genes from jellyfish aequorea and characterization of aequorins activities

LUO Wen-xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, LI Shao-wei<sup>1</sup>, CHENG Tong<sup>1</sup>,  
CHEN Min<sup>1</sup>, LI Shao-jin<sup>1</sup>, XIA Ning-shao<sup>1</sup>

(1. Cell Biology and Tumor Cell Engineering Laboratory of Ministry of Education Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. College of Oceanography and Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Two new aequorin genes——aeqxm and aeqxxm——were isolated from jellyfish *Aequorea macrodactyla* and *A. parva* respectively, which are commonly found in the warmer waters on the coastal region of East China Sea. The DNA sequences of the two genes have no introns and each one contains an ORF of 585 bp in full-length encoding a 195-aa protein. The two genes of aeqxm and aeqxxm share nucleotide homologies of 80.7% and 85.1% with AEVAQ440X respectively, and the corresponding proteins share amino acid homologies of 84.7% and 84.2% with AEVAQ440X. High amino acid homology was found between apoaeqxm and apoaeqxxm. The two genes were cloned into expression vector pTO-T7 respectively, and the expression yields were amounted to 40% of the total protein in *E. coli* BL21. The activities of the two photoproteins were reconstituted by incubating the expressed apoproteins with coelenterazine. In the presence of Ca ion, both of the regenerated aeqxm and aeqxxm exhibited an emission peak at the wave length of 470 nm.

**Key words:** *Aequorea macrodactyla*; *Aequorea parva*; aequorin; expression