

## 中华鲟半胱氨酸蛋白酶抑制剂在 毕赤酵母中的表达和活性分析

马冬梅<sup>1,2</sup> 白俊杰<sup>1\*</sup> 简 清<sup>1</sup> 劳海华<sup>1</sup> 叶 星<sup>1</sup> 罗建仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380)

<sup>2</sup>(湛江海洋大学 湛江 520425)

**摘 要** 为研究鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Cystatin)的功能并探索其在水产加工和病害防治中的应用潜力,将 PCR 改造后的编码成熟肽中华鲟(*Acipenser sinensis*)cystatin 基因亚克隆到毕赤酵母整合型表达载体 pPICZαA,氯化锂法转化毕赤酵母菌株 GS115,构建表达 cystatin 的酵母基因工程菌。经甲醇诱导、SDS-PAGE 检测培养基上清液,表明中华鲟 cystatin 在毕赤酵母中实现了高效表达,重组 cystatin 表达量约为  $215\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。纯化后重组蛋白纯度达 94.2%。生物活性检测结果表明,  $1\mu\text{g}$  重组中华鲟 cystatin 约能抑制  $15\mu\text{g}$  木瓜蛋白酶的水解活性。

**关键词** 中华鲟半胱氨酸蛋白酶抑制剂,毕赤酵母,基因表达,蛋白酶抑制活性

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0598-05

半胱氨酸蛋白酶抑制剂是广泛存在于动植物组织和体液中的蛋白酶抑制剂,它能与木瓜蛋白酶、组织蛋白酶等半胱氨酸蛋白酶形成紧密的复合物,抑制他们的活性,从而保护蛋白质的二硫键不被半胱氨酸蛋白酶破坏,阻止蛋白的降解<sup>[1]</sup>。有研究表明半胱氨酸蛋白酶抑制剂具有很好的生物防御作用,植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂可抑制致病真菌,如赤霉菌、稻瘟病菌等的生长,其作用机制可能与半胱氨酸蛋白酶抑制剂抑制了半胱氨酸肽链内切酶的水解作用有关<sup>[2]</sup>。有关鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂的研究表明,它能抑制杆状病毒所导致的鱼类培养细胞的死亡<sup>[3]</sup>,能抑制水产品的蛋白酶活性,把鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂用于水产品加工过程中可延长保鲜时间<sup>[4]</sup>。2000 年, Fugen Li 等人<sup>[5]</sup>曾报道了虹鳟 cystatin C 在大肠杆菌中的成功表达,2001 年, Tzeng SS 等人<sup>[6]</sup>在大肠杆菌中实现了鲤鱼 cystatin 的融合表达,本实验室也于 2002 年构建了表达中华鲟 cystatin 的大肠杆菌基因工程菌,成功获得具有生物活性的重组 cystatin<sup>[7]</sup>。有关鱼类 cystatin 在真核细胞中的成功表达还未见报道。鉴于鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂在病害防治和水产品加工中可能存在着巨大的应用前景,本研究采用目前广泛使用的毕赤酵

母(*Pichia pastoris*)作为表达宿主菌,构建了酵母基因工程菌,获得了具有生物活性的重组中华鲟 cystatin。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中华鲟 cystatin cDNA 的克隆质粒由本实验室克隆和构建<sup>[8]</sup>,大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存,酵母菌株 GS115、质粒 pPICZαA 和抗生素 Zeocin<sup>TM</sup>来自 Invitrogen 公司。限制酶、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶及其它主要试剂购自 Promega 公司或上海生工生物工程公司。DNA Gel Extraction Kit 为 Roche 公司产品。木瓜蛋白酶( USP/6000/mg )为 Merck 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 中华鲟 cystatin 基因改造及表达载体的构建** 根据中华鲟 cystatin cDNA 两端核苷酸序列设计引物,并委托上海生工生物工程公司合成,合成产物经 SDS-PAGE 纯化。以含有中华鲟 cystatin cDNA 的质粒为模板,用 Pfu DNA 聚合酶 PCR 扩增和改造 cystatin cDNA。经 DNA Gel Extraction Kit 纯化后,将该 PCR 产物用 *EcoR* I 酶切,连接到载体 pPICZαA

上转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用含 25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Zeocin<sup>TM</sup> 的固体 LB 培养基筛选转化子, 具体操作参照《分子克隆》<sup>[9]</sup>。重组质粒经 PCR 和 *EcoR* I 酶切鉴定, DNA 测序在 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 全自动荧光测序仪上进行, 用 DNA 分析软件 Vector NTI Suite 6.0 分析测序结果。

**1.2.2 转化酵母细胞:** 用限制酶 *Sac* I 将重组质粒 pPICZ $\alpha$ -cst 线性化后, 氯化锂法转化毕赤酵母 GS115 菌株, 将转化处理后的菌液涂布于含 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Zeocin<sup>TM</sup> 的固体 YPD 培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 2~3 d, 筛选转化子。同时转化空质粒 pPICZ $\alpha$ A 作为对照。具体方法参照 EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia* Expression Kit, Invitrogen 的说明。

**1.2.3 阳性克隆的筛选:** 利用微波炉快速制备酵母基因组 DNA 的方法<sup>[10]</sup>, 获得转化子的基因组 DNA, 用  $\alpha$ -factor 引物和 P<sub>2</sub> 为引物进行 PCR 以鉴定酵母转化子。

**1.2.4 重组酵母 Mut 表型鉴定:** 参照 EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia* Expression Kit, Invitrogen 的说明。

**1.2.5 重组菌的诱导表达及 SDS-PAGE 检测:** 将筛选到的 Mut<sup>+</sup> 表型酵母转化子单菌落接种到 BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养至 OD<sub>600</sub> = 2.0~6.0 时, 将菌体转接至 BMMY 培养基中开始诱导表达, 每 24h 收集部分酵母培养上清液, 并补加甲醇至终浓度为 0.5%, 共诱导 4d。15  $\mu\text{L}$  酵母培养上清液加入 15  $\mu\text{L}$  上样缓冲液, 进行浓度为 15% 的 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝 R250 染色检测重组蛋白。选择合适的诱导时间, 用薄层扫描仪(复日 FR-980 生物电泳图像分析系统, 上海复日科技有限公司)测定重组蛋白占总蛋白的百分比。上清液用 50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.6 Tris-HCl 透析, Bradford 法测定蛋白浓度<sup>[11]</sup>。

**1.2.6 表达产物离子交换层析纯化:** 发酵上清液在缓冲液 A (0.05 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0) 中透析过夜。Q-Sepharose FF 柱平衡、上样后, 用缓冲液 A 和缓冲液 B (0.05 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0; 1 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  NaCl) 进行连续梯度洗脱, 分部收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测重组蛋白所在峰, 凝胶薄层扫描测定重组蛋白占总蛋白的百分比。

**1.2.7 表达产物的活性分析:** 在每支试管中加入 50  $\mu\text{L}$  酪蛋白 (5.0 mg  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后, 加入 30  $\mu\text{L}$  木瓜蛋白酶 (1 mg  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和适量纯化后的重组蛋白, 再加缓冲液 (50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.6 Tris-HCl, 2 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  半胱氨酸盐酸盐, 0.1 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  EDTA) 至终体积 300  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 20 min 后, 加入 3 mL 考马

斯亮蓝 G250 溶液, 混匀, 室温放置 20 min, 测定 OD<sub>595</sub>, 抑制活性由下列公式反映:

$$\Delta OD_{595} = OD_{595} - OD_{595}'$$

其中  $\Delta OD_{595}$  表示加入重组 cystatin 与不加重组 cystatin 的两个反应吸光度的变化值,  $OD_{595}$  表示加入适量重组 cystatin, 反应 20 min 后的吸光度,  $OD_{595}'$  表示不加重组 cystatin, 木瓜蛋白酶将酪蛋白完全分解时 595 nm 的吸光度。每一数据测定 3 次, 取平均值。此外还分别以不加木瓜蛋白酶、只加酪蛋白的管作对照。

## 2 结 果

### 2.1 重组质粒的构建和鉴定

为了使中华鲟 cystatin cDNA 适合重组于表达载体 pPICZ $\alpha$ A, 设计并合成了 1 对 PCR 扩增引物对该基因进行改造:

P<sub>1</sub> 为 5'-CG GAA TTC ATG GGT TTG GTC GGA GGC CCC-3'

P<sub>2</sub> 为 5'-CG GAA TTC TTA AGT GCA GGT ATT TT-3'

P<sub>1</sub> 是 5' 端引物, 包括中华鲟 cystatin 成熟肽编码序列的第一个碱基开始的 21 个碱基和 1 个 *EcoR* I 酶切位点; P<sub>2</sub> 为 3' 端引物, 包括从中华鲟 cystatin 成熟肽编码序列终止码开始反向的 17 个碱基和 1 个 *EcoR* I 酶切位点。以含有中华鲟 cystatin cDNA 的克隆质粒为模板, P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物, PCR 扩增得到约 350 bp 的 DNA 片段, 将该片段插入表达载体 pPICZ $\alpha$ A 多克隆位点中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。经 *EcoR* I 酶切, 重组子有约 350 bp 的片段插入。再用 P<sub>2</sub> 引物和载体上多克隆位点上游的  $\alpha$ -factor 引物 (P<sub>3</sub>) 进行 PCR 鉴定, 扩增得到约 700 bp 的片段, 说明重组基因的插入方向是正确的 (图 1), 该重组质粒命名为 pPICZ $\alpha$ -cst<sub>0</sub>。

为进一步检测重组质粒中外源基因的改造结果是否有突变发生, 对插入部分进行了序列测定, 测序结果表明改造后的基因与预期设计的序列完全一致, 扩增和构建中没有发生基因突变。

### 2.2 重组质粒转化酵母及阳性克隆的筛选和鉴定

将 pPICZ $\alpha$ -cst 回收纯化, *Sac* I 酶切线性化, 用氯化锂法转化毕赤酵母 GS115 菌株, 从中筛选得到 8 个抗 Zeocin<sup>TM</sup> 的转化子, 提取转化子基因组 DNA, 利用  $\alpha$ -factor 引物和 P<sub>2</sub> 为引物进行 PCR 鉴定, 结果都扩增出了约 700 bp 的片段, 阳性率为 100%。表型

鉴定结果表明,只有 1 个重组子为 Mut<sup>s</sup>,其余均为 Mut<sup>+</sup> 表型。

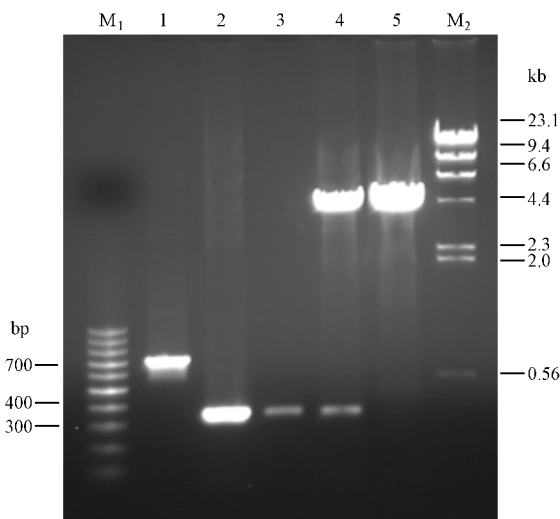


图 1 重组质粒 pPICZα-cst 的 PCR 和酶切分析  
Fig.1 The PCR and restriction mapping analysis of recombinant plasmids pPICZα-cst

- M1. 100bp DNA marker ; M2. λ DNA/*Hind* III marker ;  
1. PCR products with P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> ; 2. PCR products with P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> ;  
3. Cystatin cDNA 4. pPICZα-cst digested with *Eco*R I ;  
5. pPICZαA digested with *Eco*R I

2.3 重组菌的诱导表达及 SDS-PAGE 检测

接种单菌落 Mut<sup>+</sup> 表型重组酵母 GS115( pPICZα-cst ),同时以整合空载体的酵母菌株 GS115 ( pPICZαA )为对照 ,诱导表达 4d ,其间每 24h 取一次酵母培养上清 ,经 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色后 ,可见重组蛋白条带 ,质量约为 14kD (图 2 )。表达量随诱导时间的延长而增加 ,在诱导 24h 后开始有表达产物出现 ,诱导 72h 后表达量最高。将诱导表达 72h 的上清液 SDS-PAGE 凝胶用薄层扫描仪扫描 ,重组蛋白占总蛋白的 76.3%。Bradford 法测定蛋白浓度为 282mg · L<sup>-1</sup> ,据此推测 cystatin 的表达量约为 215mg · L<sup>-1</sup>。

2.4 表达产物的离子交换层析纯化

在 50mL 培养基中诱导重组酵母 ,上清液经透析后 ,Q-Sepharose FF 柱层析纯化 ,SDS-PAGE 检测收集的样品 ,结果纯化后重组蛋白的纯度达 94.2%。

2.5 表达产物的活性分析

以加入抑制剂的量为横坐标 ΔOD<sub>595</sub> 为纵坐标 ,制作重组 cystatin 对木瓜蛋白酶的抑制活性曲线。抑制作用曲线分析表明 :以 30μg 木瓜蛋白酶为底物 ,cystatin 的量在 2μg 以内时 ,抑制活力随抑制剂增加成比例增强 ,具有很好的线性关系 ,曲线方程为  $y$

$= 0.4017x$  (  $R^2 = 0.9722$  ) (图 3 )。当 cystatin 的量大于 2μg 时 ,曲线就不符合上述方程 ,可能是由于竞争性抑制作用 ,此时木瓜蛋白酶已经完全被抑制 ,再增加抑制剂的量 ,抑制活力也不会再增加。重组 cystatin 的活性随着温度的升高而降低 ,在 70℃ ~ 80℃ 之间活性下降最快 ,90℃ 以上基本没有活性。而在 70℃ 重组 cystatin 的活性随着处理时间的延长而明显降低 ,呈现较好的线性关系 ,曲线方程为  $y = - 1.0133x + 83.07$  (  $R^2 = 0.8479$  ) ,处理 60min 后只有 20% 活性。

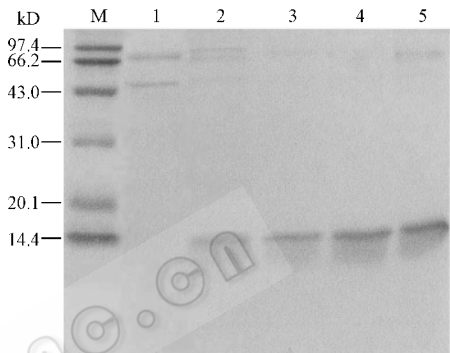


图 2 SDS-PAGE 检测 cystatin 在毕赤酵母中的表达  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression of cystatin in *Pichia pastoris*

1. Expression product of GS115( pPICZαA ) ;  
2 ~ 5. Expression product of GS115 ( pPICZαA-cystatin ) after 24h, 48h, 72h, 96h induction ;  
M. LMW protein marker

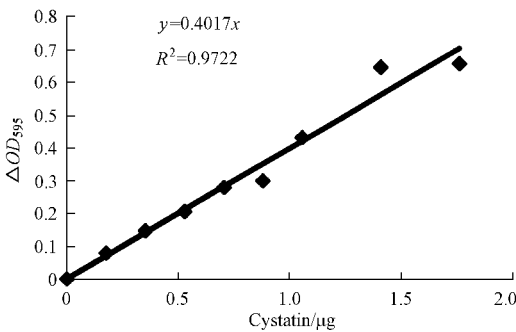


图 3 重组 cystatin 抑制活性曲线

Fig.3 The curve of cystatin inhibitory activity  
Substrate : papain ; Reaction period : 20min ;  
Reaction temperature : 37℃ ;  
Buffer : 50mmol · L<sup>-1</sup> pH7.6 Tris-HCl , 2mmol · L<sup>-1</sup> Cys-HCl , 0.1mmol · L<sup>-1</sup> EDTA

3 讨 论

本实验首次实现了鱼类 cystatin 基因在酵母中的表达 ,据报道 Li 等人也曾利用酵母表达虹鳟 cys-

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

tatin C,但未获得成功<sup>[5]</sup>。我们选用的毕赤酵母表达系统是近年来被广泛使用的外源基因表达系统,该系统具有遗传稳定、适于高密度培养、表达产量高、重组表达产物背景杂蛋白少和表达产物易于纯化等优点,是真核基因表达的理想宿主,适合较大规模生产<sup>[12,13]</sup>。在线性化用于转化酵母的重组质粒时,我们曾采用 *Sac* I 和 *Dra* I 两种酶进行酶切,*Sac* I 和 *Dra* I 都是 5' *AOX1* 基因内的酶切位点,相距 205bp,化学转化 3 次后,只有利用 *Sac* I 酶切的重组质粒转化后有转化子,用 *Dra* I 酶切的重组质粒始终没能转化成功,可能是外源基因结构不同影响了适于整合的位点,具体原理还有待于进一步探讨。重组中华鲟 cystatin 酵母工程菌在没有选择压力的 YPD 液体和固体培养中连续转接 5 次,再用含抗生素的培养基筛选,未发现外源基因丢失,说明该酵母工程菌株十分稳定。

在抑制活性方面,与邓俊林等<sup>[14]</sup>所测得的玉米巯基蛋白酶抑制剂的活力和在大肠杆菌中表达的中华鲟 cystatin 的活性<sup>[7]</sup>进行比较,1 $\mu$ g 毕赤酵母表达的重组中华鲟 cystatin 约能抑制 15 $\mu$ g 木瓜蛋白酶;1 $\mu$ g 玉米巯基蛋白酶抑制剂(半胱氨酸蛋白酶抑制剂又称为巯基蛋白酶)约能抑制 0.278 $\mu$ g 木瓜蛋白酶;1 $\mu$ g 大肠杆菌表达的重组中华鲟 cystatin 约能抑制 3 $\mu$ g 木瓜蛋白酶。重组中华鲟 cystatin 的抑制活力较强可能与中华鲟 cystatin 的特殊结构有关,在水产品加工中,鲟鱼肉质结构好,肌肉不易软化,易于保存,这也暗示中华鲟 cystatin 可能有其特殊的结构。毕赤酵母表达的重组中华鲟 cystatin 抑制活力约是大肠杆菌表达的 cystatin 活力的 5 倍,分析其原因,除了在毕赤酵母中表达的重组 cystatin 纯度高以外,可能与原核表达的重组 cystatin 在复性过程中不能完全正确地折叠,只有部分表达产物能够正确折叠成为具有活性的蛋白有关。Li 等人<sup>[5]</sup>用 E-64(1 种蛋白酶抑制剂)为标准样品,以木瓜蛋白酶为底物,测定与 E-64 当量的大肠杆菌表达的虹鳟 cystatin C 的活性,结果表明只有 20% 重组表达产物能够正确折叠,获得生物活性。重组中华鲟 cystatin 耐高温的性能与 Tzeng SS 等人<sup>[6]</sup>报道的重组鲤鱼 cystatin 在 60℃ 保温 5min 抑制活性没有明显降低相似,但玉米巯基蛋白酶抑制剂在 100℃ 以内保温 20min,仍有 100% 的活性<sup>[14]</sup>,说明鱼类和玉米的半胱氨酸蛋白酶抑制剂的结构有很大差别。重组中华鲟 cystatin 耐高温的性能较低,如用于水产品加工的添加剂,生产风味食品,只要在食用前煮即可使 cystatin 失活,

确保重组 cystatin 应用的安全性。总之,与大肠杆菌表达的重组 cystatin 相比,毕赤酵母表达系统表达的重组 cystatin 有更高的表达量、更高的蛋白酶抑制活性、更有利于重组蛋白的分离和下游加工工作,具有较好的工业化应用前景。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Barrett A J, Rwlings N D, Davies M E *et al.* Proteinase inhibitors. London: Academic Press, 1986, pp. 515 - 569
- [2] ZENG Z K(曾仲奎), BAO J K(鲍锦库), ZHOU H(周红) *et al.* The molecular modification of cysteine proteinase inhibitor from wheat seed and its activity. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 1997, **30**(1): 38 - 43
- [3] Björklund H V, Johansson T R, Rinne A. Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor. *J Virol*, 1997, **71**: 5658 - 5662
- [4] Li F, An H, Seymour T A *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and expression distribution of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)*, 1998, **121**: 135 - 143
- [5] Li F, An H, Seymour T A *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C: expression in *Escherichia coli* and properties of the recombinant protease inhibitor. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)*, 2000, **125**: 493 - 502
- [6] Tzeng S S, Chen G H, Chung Y C *et al.* Expression of soluble form carp (*Cyprinus carpio*) ovarian cystatin in *Escherichia coli* and its purification. *J Agric Food Chem*, 2001, **49**(9): 4224 - 4230
- [7] MA D M(马冬梅), BAI J J(白俊杰), LAO H H(劳海华) *et al.* Expression of *Acipenser sinensis* cystatin in prokaryote. *J Fisheries of China*(水产学报), 2003, **27**(3): 239 - 244
- [8] BAI J J(白俊杰), LAO H H(劳海华), YE X(叶星) *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cystatin mature peptide cDNAs from two species of sturgeons. *Acta Zoologica Sinica*(动物学报), 2002, **48**(4): 540 - 543
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] LUO X(罗樾), LIU Q Y(刘秋云), HE R(赫然) *et al.* Rapid preparation plasmids and genomic DNA PCR templates of yeast by use of microwave oven. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), 2001, **12**(2): 116
- [11] WANG J Z(汪家政), FAN M(范明). Protein technological manual(蛋白质技术手册), Beijing: Science Press(科学出版社), 2002
- [12] Siegel R S, Brierley R A. Methylophilic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, **34**: 403 - 404
- [13] OUYANG L M(欧阳立明), ZHANG H Z(张惠展), ZHANG S L(张嗣良) *et al.* Advances in studies of *Pichia pastoris* as a heterol-

sics(生物化学与生物物理进展) 2000, 27(2):151-154

sity( Natural Science Edition )(四川大学学报自然科学版),

[ 14 ] DENG J L( 邓俊林 ), ZENG Z K( 曾仲奎 ). Purification and characterization of a corn cysteine proteinase inhibitor. *J Sichuan Univer-*

1998, 35(1):107-111

## Expression of Chinese Sturgeon Cystatin in Yeast *Pichia pastoris* and Its Proteinase Inhibitory Activity Analysis

MA Dong-Mei<sup>1 2</sup> BAI Jun-Jie<sup>1 \*</sup> JIAN Qing<sup>1</sup> LAO Hai-Hua<sup>1</sup> YE Xing<sup>1</sup> LUO Jian-Ren<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China )

<sup>2</sup>( Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 520425, China )

**Abstract** Cystatin, which widely distributed in both tissues and body fluids of animal and plant, was a superfamily of cysteine proteinase inhibitors. It could form activity-inhibitor complexes with cysteine proteinases to inhibit the hydrolytic activity of proteinases. Cystatin played important roles not only in the inhibition of the proteolytic degradation of fish muscle, but also in biological defense systems against invaders. To explore the functions of fish cystatin and the potential values in fish disease prevention and cure, as well as seafood processing, the recombinant yeast strains which could express Chinese sturgeon cystatin were constructed. First, the cystatin cDNA of Chinese sturgeon, which had been PCR modified, was subcloned into yeast integrated vector pPICZaA. After extracted and purified, the recombinant plasmids were linearized by *Sac* I. The yeast *Pichia pastoris* GS115 strain was transformed by use of the Lithium Chloride transformation method, and the recombinant cystatin yeast strains got. After 0.5% methanol induction, SDS-PAGE analysis of the culture supernatant indicated that the yield of recombinant cystatin was about  $215\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  with the percentage about 73.6%. The recombinant cystatin was purified through Q-Sepharose anion-exchange chromatography, and the purity reached about 94.2%. The inhibitory activity of recombinant cystatin was measured by inhibiting the proteinase activity of papain. The results showed that about  $1\mu\text{g}$  recombinant cystatin could inhibit the activity of  $15\mu\text{g}$  papain. Heat stability assay results showed that there was a decrease in inhibitory activity of cystatin with the increasing of temperature. When solution of recombinant cystatin was kept at  $70^\circ\text{C}$  for 5min, the inhibitory activity reduced fast. While the recombinant cystatin was heated to  $90^\circ\text{C}$  for 5min, the inhibitory activity of recombinant cystatin was undetected. The inhibitory activity for recombinant Chinese sturgeon cystatin was higher than that of CPI( cysteine proteinase inhibitor ) from seeds of corn, that about  $1\mu\text{g}$  purified CIP could inhibited the activity of  $0.278\mu\text{g}$  papain. But the heat stability of recombinant cystatin is lower than that of the corn CPI. The expression level and the activity of recombinant cystatin from yeast *Pichia pastoris* were higher than those from *E. coli*. Moreover, recombinant cystatin from *Pichia pastoris* was easier to separate and purify. This paper reported that recombinant fish cystatin was produced in a highly efficient expression system based on the methylotrophic yeast, further work will focus on the function of recombinant Chinese sturgeon cystatin to resist fish disease and explore the value of cystatin as a food additive to inhibit cysteine proteinases during surimi processing.

**Key words** Chinese sturgeon( *Acipenser sinensis* ) cystatin, *Pichia pastoris*, gene expression, proteinase inhibitory activity

Received : 03-01-2003

This work was supported by Grants from Chinese Academy of Fishery Sciences Foundation( No. 01-08-02 ), Guangdong Province Natural Science Funding ( No.021642 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-20-81616127 ; Fax : 86-20-81616162 ; E-mail : jjbai@163.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>