

长爪沙鼠 CST3 序列同源性分析及蛋白体外表达^{*}

王妍 郭萌 杜小燕 李长龙 路静 霍学云 吕建祯 刘欣 陈振文

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

摘要:目的 分析长爪沙鼠半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (Cystatin C, CST3) cDNA 序列同源性, 并建立 CST3 蛋白原核表达体系, 为长爪沙鼠 CST3 抗体制备和后续基因功能研究奠定基础。方法 对长爪沙鼠 *Cst3* cDNA 序列进行克隆、同源性分析及密码子优化; 将优化后序列酶切连接到 *pET28a* 载体, 完成重组 CST3 蛋白表达载体构建; 将该载体转化到感受态细胞中, 通过异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG) 诱导实现 CST3 蛋白的原核表达, 并用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 验证。结果 长爪沙鼠 *Cst3* 基因与人和小鼠 *Cst3* 基因的序列同源性较低。密码子优化后的长爪沙鼠 *Cst3* 表达序列插入到 *pET28a* 质粒中, 获得了 CST3 蛋白表达载体。经 1 mmol/L IPTG 37 °C 诱导 12 h, 可获得大量 CST3 蛋白。结论 成功地构建了长爪沙鼠 CST3 蛋白的体外表达体系。

关键词:长爪沙鼠; CST3; 原核表达

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1006-6179(2019)02-0001-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.001

长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*) 又名蒙古沙鼠 (*Mongolian gerbil*), 为啮齿类动物家族成员, 是源自我国的实验动物资源^[1]。由于其独特的解剖结构、生理学和行为学特征, 长爪沙鼠在许多研究领域具有特殊的应用价值, 如脑神经病研究、寄生虫病研究、微生物学研究、听觉和视觉研究、内分泌研究、代谢研究、肿瘤及其他疾病研究^[1-2]。可以说, 长爪沙鼠被称为“多功能实验动物”。随着长爪沙鼠线粒体和全基因组测序^[2]的完成, 以及癫痫易患模型^[3]、自发糖尿病模型^[4]、脑缺血高发群体^[5]等长爪沙鼠动物模型群体的建立, 长爪沙鼠逐渐成为相关研究领域的一种“热门”实验动物。近年来, 在长爪沙鼠近交系和封闭群培育过程中, 我们在证实长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环 (circle of Willis, CoW) 变异缺失具有遗传性的基础上, 通过抑制消减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 方法, 发现半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (Cystatin C, CST3) 的表达变化与长爪沙鼠脑血管畸形相关^[6]。为了进一步研究长爪沙鼠 CST3 的功能和参与血管发育的机制, 我们比对了 CST3 序列同源性, 构建了长爪沙

鼠 CST3 蛋白表达载体, 对其进行原核表达和鉴定, 为制备长爪沙鼠 CST3 抗体和进行后续的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取来自首都医科大学实验动物部的封闭群长爪沙鼠 1 只, 雄性, 16 周龄, 饲养于普通环境中 (SYXK (京) 2013-0005)。将长爪沙鼠过量麻醉安乐死后, 于冰上立即解剖, 获取长爪沙鼠新鲜脑组织。组织采集后保存于液氮中。

1.2 主要实验材料

pET28a 质粒为实验室保存; 克隆载体 *pMD19-T* (Takara, 日本); FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒、胶回收试剂盒、无内毒素大提质粒试剂盒、*E. coli* BL21 感受态细胞、*E. coli* DH5a 感受态细胞均购自天根公司; TRIzol Reagent (Invitrogen, 美国); *Nco*I 和 *Xho*I 限制性内切酶 (NEB, 美国); IPTG、硫酸卡那霉素、氨苄青霉素均购自索莱宝公司。

收稿日期: 2018-09-20

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31572341, 31572348 和 31772545); 首都医科大学基础临床合作课题 (No. 17JL70)

作者简介: 王妍 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 遗传学。E-mail: wang_1992@163.com

通信作者: 陈振文 (1959—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 遗传与发育研究。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 制备: 取约 0.1 g 脑组织, 加入到 1 mL TRIzol 试剂中进行组织匀浆, 混匀后室温消化 10 min。加入 200 μ L 三氯甲烷, 颠倒混匀后冰上放置 15 min, 13 500 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。将上清液转移至新的离心管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 颠倒混匀后冰上放置 15 min, 13 500 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃上清。加入无核酶冰 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 13 500 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 后弃上清。自然风干后无核酶水溶解, 获得长爪沙鼠脑组织总 RNA。使用 Nanodrop 2000c (Thermo scientific, USA) 测量总 RNA 浓度和纯度, 并根据 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书要求进行反转录获得 cDNA。

1.3.2 *Cst3* 基因蛋白质编码区 (coding sequence, CDS) 克隆和测序: 根据 NCBI 提供的长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列 (GenBank: KM517575.1) 两端设计 *Cst3* 基因 CDS 区克隆的上下游引物, 上游引物序列为 “5'-ATGGCTAGCCCACTACGATCC-3'”、下游引物序列为 “5'-TTAAGCGCTTTTGCAGCTGGA-3'”, 并用该引物将 *Cst3* 基因 CDS 区序列从长爪沙鼠脑组织 cDNA 中扩增出来, PCR 扩增体系为 50 μ L 体系, PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 35 个循环 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、57 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min 后, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳及胶回收后, 将回收产物连接到 *pMD19-T* 载体上进行 TA 克隆测序, 以获得长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列。

1.3.3 基因序列同源性比对: 在 NCBI 上查询小鼠 (NCBI Reference Sequence: NM_009976.4) 和人类 (GenBank: CR542018.1) *Cst3* 基因 CDS 区序列, 用 DNAMAN 软件将其与长爪沙鼠的 *Cst3* 基因序列进行比对, 同时进行氨基酸序列比对。

1.3.4 质粒载体构建: 去除长爪沙鼠 CST3 蛋白信号肽区域 (1~20 aa) 后, 对剩余蛋白质全长的对应 *Cst3* 基因序列进行密码子优化、在 N 端加入 His 标签, 并通过化学合成获得对应的基因片段, 合成的片段通过 *Nco*I 和 *Xho*I 位点酶切、连接, 将合成序列插入到 *pET28a* 质粒载体中。

1.3.5 重组蛋白的诱导表达和检测: 将 *pET28a-CST3* 质粒和 *pET28a* 空质粒载体分别转化到 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 涂板、克隆及培养。用 30 mL 卡那霉素抗性的 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 扩增菌液, 在对数

扩增期加入 IPTG 诱导, 使其终浓度为 1 mmol/L。收集菌液后取全菌液上清和沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blotting 检测。

1.3.6 SDS-PAGE 凝胶电泳: 将各组蛋白进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳条件为: 80 V 恒压电泳 30 min, 120 V 电泳至结束。随后, 用考马斯亮蓝染液染色过夜并进行脱色。

1.3.7 Western blotting 实验: 将 SDS-PAGE 凝胶使用 Bio-Rad 蛋白质转膜系统将蛋白质电转至 0.22 μ m 硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, NC 膜) 上, 用 0.5% 封闭用脱脂奶粉封闭后, 使用 His 抗体 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 充分洗涤后, 用辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记抗鼠血清二抗室温孵育 1 h。再次充分洗涤后, 进行化学发光, 用 Bio-Rad 凝胶图像分析系统进行图像采集分析。

2 结果

2.1 长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区克隆测序分析

为构建 CST3 原核表达载体, 我们首先以长爪沙鼠脑 cDNA 为模板, 扩增了 *Cst3* 基因 CDS 区, 并连接到 *pMD19-T* 载体上进行克隆测序。利用 DNAMAN 软件将测序结果与 GenBank 中长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列比对。结果显示, 长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区长度为 429 bp, 我们克隆的长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列与 GenBank 序列仅相差一个碱基 (图 1), 并导致一个氨基酸的差异。

2.2 长爪沙鼠 *Cst3* 基因同源性分析

为判断长爪沙鼠 *Cst3* 基因序列同源性, 我们利用 DNAMAN 软件分别将长爪沙鼠与人、小鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列进行比对 (图 2)。长爪沙鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列与人、小鼠的同源性分别为 68.90% 和 79.49%。同时, 我们也比较了长爪沙鼠与人、小鼠 CST3 蛋白氨基酸序列的同源性。结果显示, 长爪沙鼠 CST3 蛋白氨基酸序列与人、小鼠的序列同源性分别为 63.51% 和 71.83% (图 3)。这些比对结果显示, 长爪沙鼠 *Cst3* 基因与人、小鼠序列同源性较低, 保守性较差。这提示, 在进行长爪沙鼠 CST3 蛋白研究时, 不宜使用小鼠或人类 CST3 蛋白或抗体。

2.3 长爪沙鼠 CST3 蛋白表达载体构建

为建立长爪沙鼠 CST3 蛋白体外表达体系, 将

长爪沙鼠 CST3 蛋白与人、小鼠 CST3 蛋白比对分析,结果表明长爪沙鼠 CST3 蛋白的 1~20 氨基酸 (amino acid, aa) 为信号肽区域,21~142 氨基酸为 CST3 蛋白功能区域。由于长爪沙鼠 CST3 蛋白编码序列中稀有密码子较多,GC 含量偏高,因此,我们在去除序列中的信号肽后,对 CST3 蛋白编码序列进行了密码子优化,更换了 75 个同义密码子(图 4)。化学合成优化后的编码序列,并将其酶切连接

到 *pET28a* 蛋白表达载体中构建 CST3 蛋白体外表达载体,以获得 N 端携带 6X His 标签的重组长爪沙鼠 CST3 蛋白。将质粒转化到 *E.coli DH5a* 感受态细胞中,并进行克隆测序,结果显示载体序列与预期一致,带有 His 标签的重组长爪沙鼠 CST3 蛋白表达载体构建成功(图 5)。预计该重组蛋白总长为 143 个氨基酸,其中包含 N 端 6X His 标签和沙鼠 CST3 蛋白 21~142 aa,分子量大约为 15 kDa。

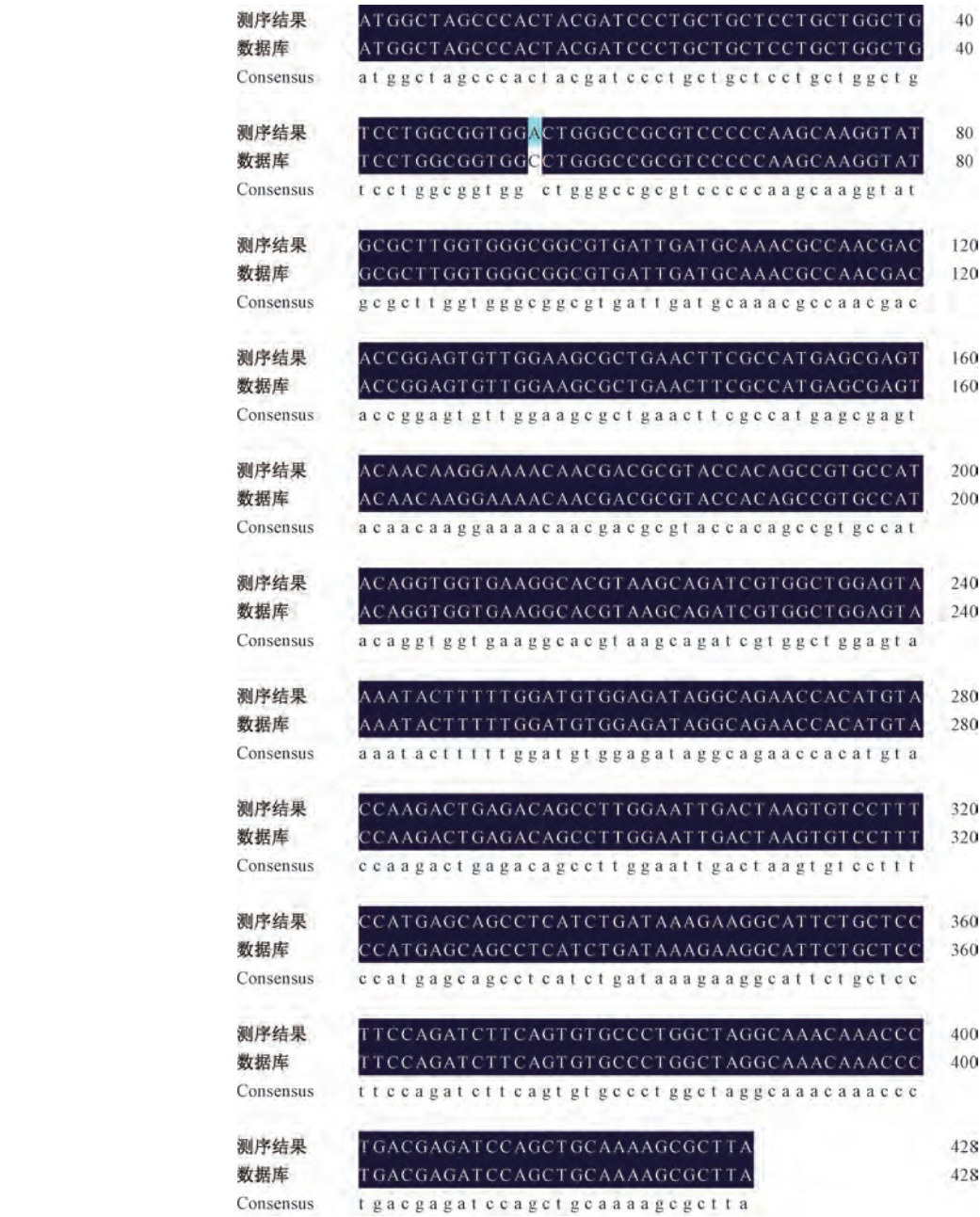


图 1 长爪沙鼠 *Cst3* CDS 区克隆测序与 GenBank 长爪沙鼠 *Cst3* CDS 区序列比对结果
Fig.1 The alignment analysis between *Cst3* CDS sequences we cloned here and GenBank *Cst3* CDS sequences of Mongolian gerbils

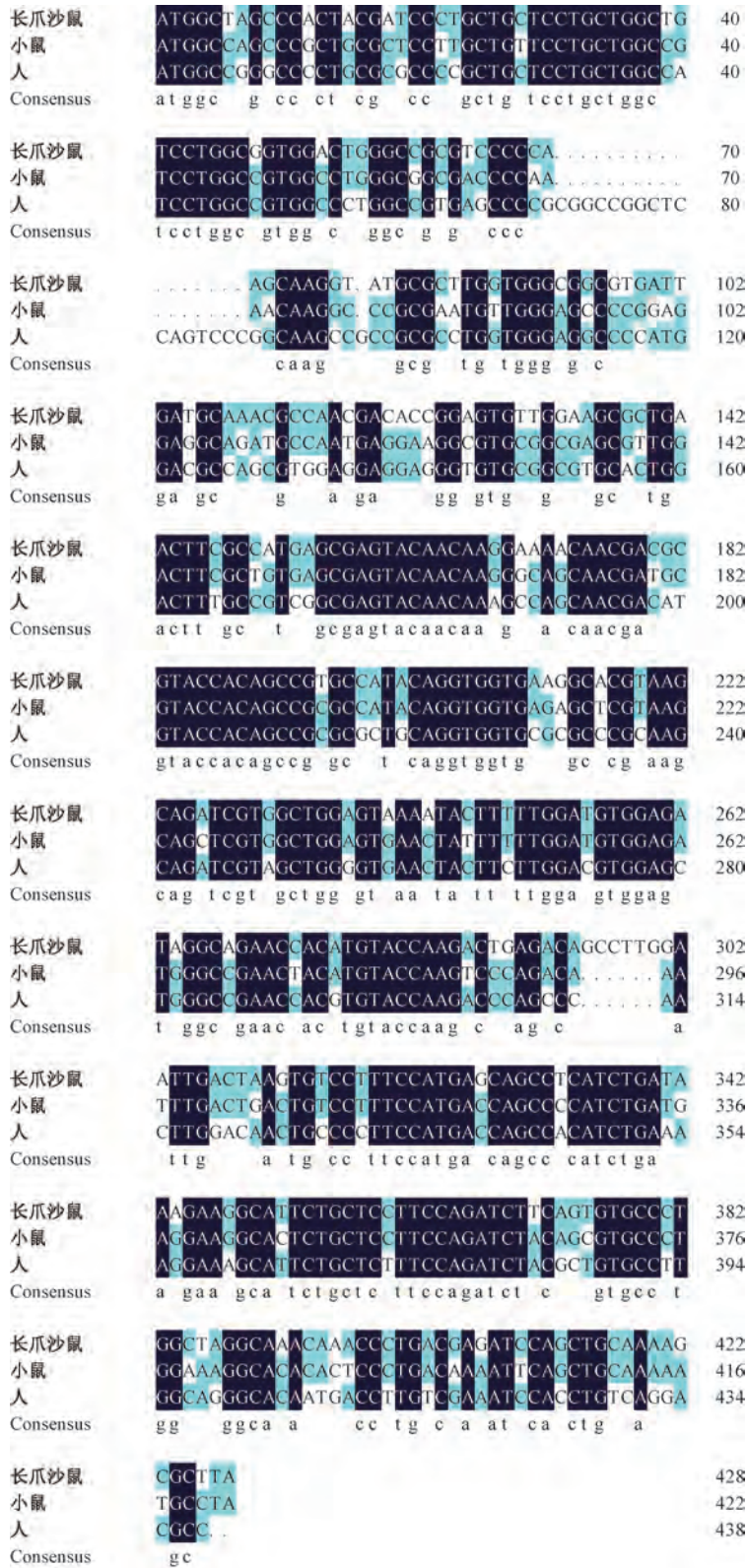


图 2 长爪沙鼠与人、小鼠 *Cst3* 基因 CDS 区序列比对

Fig.2 The alignment analysis of *Cst3* CDS sequences among Mongolian gerbils, human and mice

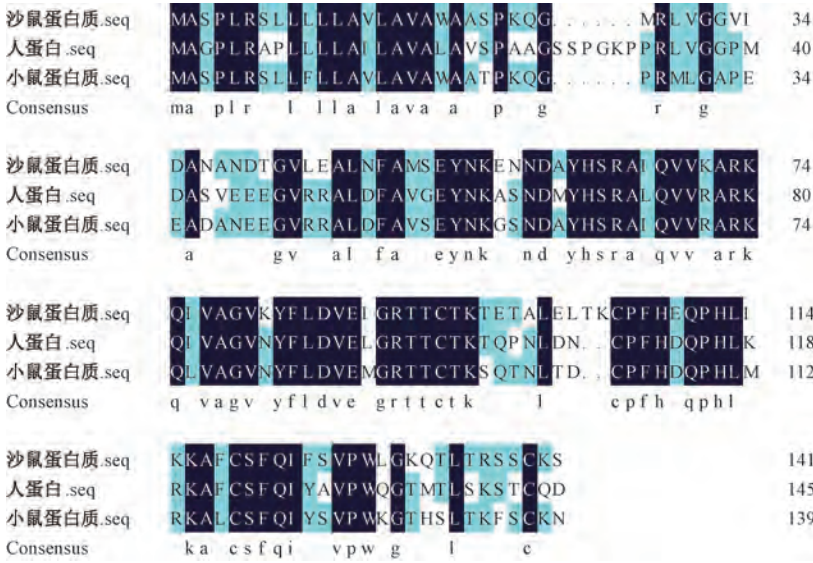


图 3 长爪沙鼠与人、小鼠 CST3 蛋白氨基酸序列比对
Fig.3 The alignment analysis of CST3 amino acid sequences among Mongolian gerbils , human and mice

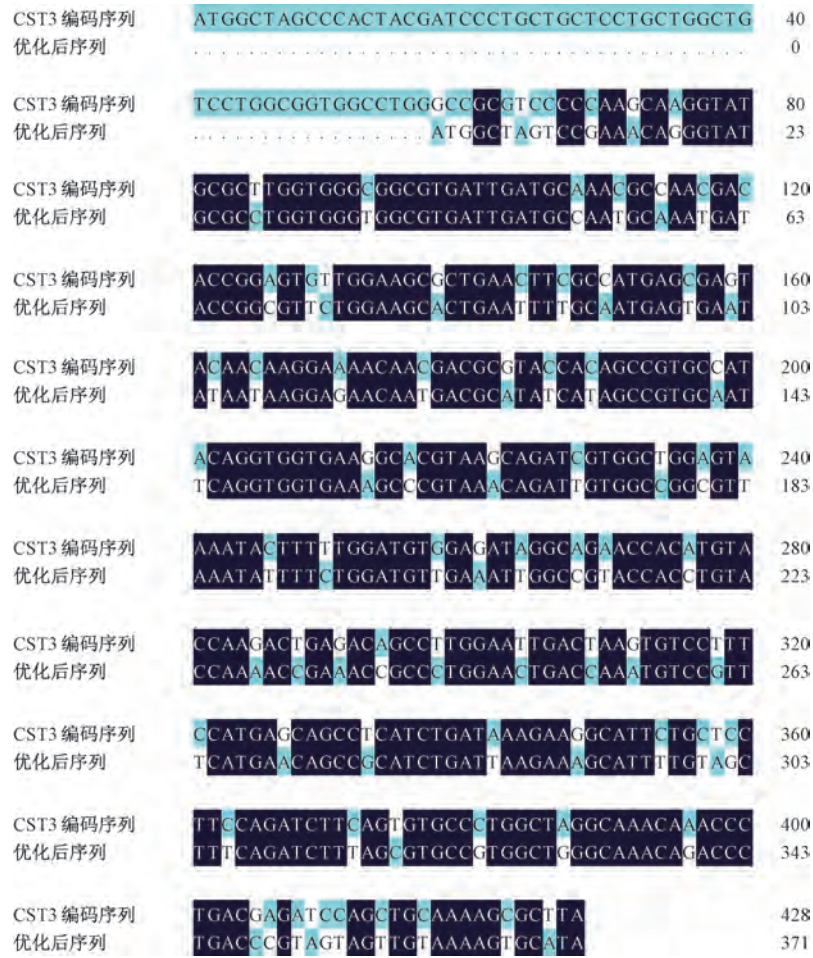


图 4 长爪沙鼠 CST3 蛋白编码序列密码子优化方案
Fig.4 Codon optimization scheme for CST3 coding sequences of Mongolian gerbils

AGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGG
AATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT
TTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAC
AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGTCCGAAAC
AGGGTATGCGCCTGGTGGGTGGCGTGATTGATGCCAATGCAAATGAT
ACCGGCGTTTCTGGAAGCACTGAATTTTGCAATGAGTGAATATAATAAG
GAGAACAAATGACGCATATCATAGCATGGCTAGTCCGCGTGCAATTCAG
GTGGTGAAAGCCCGTAAACAGATTGTGGCCGGCGTTAAATATTTTCT
GGATGTTGAAATTGGCCGTACCACCTGTACCAAAACCGAAACCGCCC
TGGAAC TGACCAAATGTCCGTTTCATGAACAGCCGCATCTGATTAAG
AAAGCATT TTTGTAGCTTT CAGATCTTTAGCGTGCCGTGGCTGGGCAA
ACAGACCCTGACCCGTAGTAGTTGTAAAAGTGCATAACTCGAGCACC
ACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGG

图 5 长爪沙鼠 CST3 蛋白表达质粒测序结果

注：下划线部分为 CST3 蛋白编码序列，加粗黑字为起始密码子和终止密码子，黄色阴影为 T7 启动子，红色为 His 标签

Fig.5 The partial sequences of recombinant CST3 protein expression vecto

Note: The underlined parts are CST3 protein coding sequences, the bold parts were the start codon and the stop codon, the yellow shade parts were the T7 promoter sequences, and the red font parts were the His tag sequences.

2.4 CST3 蛋白体外诱导表达和鉴定

为优化蛋白体外表达条件，我们使用不同浓度和处理时间的 IPTG 对转入重组 CST3 蛋白表达质粒的 *E.coli* BL21 感受态细胞进行诱导表达。SDS-PAGE 凝胶电泳显示，与对照相比，0.2 mmol/L IPTG 诱导并无特异性蛋白表达，而 1 mmol/L IPTG 37 ℃ 诱导表达 12 h 后在分子量约 15 KDa 处出现单

一目的条带。对蛋白进行 Western blotting 检测 His 标签表达情况，结果显示 IPTG 诱导组有特异性 His 表达，大小与重组 CST3 蛋白大小一致，并且 His 蛋白表达结果也表明 1 mmol/L IPTG 37 ℃ 诱导表达 12 h 是诱导沙鼠 CST3 蛋白表达的最佳条件(图 6)。综上，我们成功建立了 CST3 蛋白体外诱导表达系统，获得约 15 kDa 的重组沙鼠 CST3 蛋白。

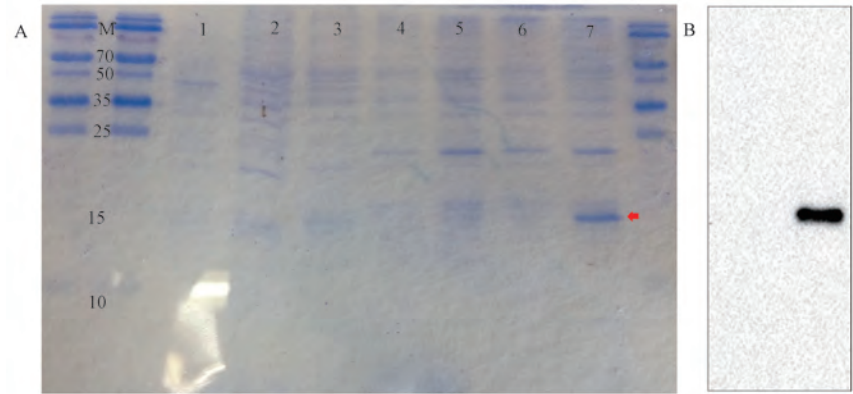


图 6 长爪沙鼠 CST3 蛋白的体外诱导表达

注：A:SDS-PAGE 凝胶电泳结果；B:Western blotting 结果；M:蛋白 marker,1 为 *pET28a* 载体；2、3、4 分别为 0.2 mmol/L IPTG 37 ℃ 诱导 4 h、8 h 和 12 h,5、6、7 分别为 1 mmol/L IPTG 37 ℃ 诱导 4 h、8 h 和 12 h,红箭头为目的条带

Fig.6 Induced expression of gerbil CST3 protein in vitro.

Note: A:SDS-PAGE electrophoresis; B:Western blotting; M:protein ladder; 1, *pET28a* vector; 2~4,induced by 0.2 mmol/L IPTG at 37 ℃ for 4 h, 8 h and 12 h, respectively; 5~7,induced by 1 mmol/L IPTG at 37 ℃ for 4 h, 8 h and 12 h, respectively. Red arrows indicated the target protein

3 讨论

半胱氨酸蛋白酶在多个生物过程,如在蛋白质

转运,前蛋白加工,骨重塑,和细胞凋亡等过程中发挥重要作用^[7-8],也参与多种病理过程,如心血管疾病和炎症等。因此,半胱氨酸蛋白酶的活性需要被抑制剂严格控制。CST3 又称胱抑素 C(Cys C),是

半胱氨酸蛋白酶的一种重要的内源性抑制剂^[9],属于蛋白酶抑制剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 II 型超家族,是由 *Cst3* 基因编码、分子量为 13 kDa 的分泌蛋白。CST3 是一种非糖基化碱性蛋白质,广泛存在于各种体液及组织的有核细胞中,参与调控细胞内外的蛋白水解酶,保护细胞使其免受细胞内和细胞外蛋白水解酶的水解,是目前发现的对组织蛋白酶 B 抑制作用最强的蛋白酶抑制剂^[10]。血清 CST3 水平具有一定的诊断价值,是癌症、心血管疾病和炎性肺病等疾病的预后标志之一^[11-12]。当肾功能和肾小球滤过率下降时,血清 CST3 水平显著升高。而循环中 CST3 水平降低则与动脉粥样硬化斑块形成有关。此外,CST3 异常表达也参与肿瘤转移、自身免疫疾病、肝功能障碍和阿尔兹海默症的淀粉样蛋白沉积等疾病的发生发展^[13-16]。人类 *Cst3* 基因位于第 20 号染色体短臂 13 区 2 上,总长约 4.3 kb,包含 3 个外显子和 2 个内含子,编码 146 个氨基酸的 CST3 蛋白。而小鼠 CST3 蛋白有 140 个氨基酸,长爪沙鼠 CST3 蛋白总长为 142 个氨基酸。核酸和氨基酸序列比对结果显示,沙鼠 CST3 蛋白序列与人、小鼠 CST3 序列同源性都较低。因此,在进一步研究长爪沙鼠 CST3 基因功能时,特异性抗体和 CST3 蛋白不宜使用现有人源性或小鼠源性产品,建立长爪沙鼠 CST3 蛋白的体外表达体系十分必要。

Cst3 是一个多态性非常强的基因,在人类 CST3 蛋白编码区就有 223 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点。现有研究表明,多种 *Cst3* 基因的 SNP 位点与糖尿病、肥胖、冠心病、阿尔兹海默症和代谢综合征等疾病的发生发展相关^[10,17-20]。在建立长爪沙鼠 CST3 蛋白体外表达体系时,我们克隆的封闭群长爪沙鼠 *Cst3* CDS 区序列与 GeneBank 中 *Cst3* cDNA 序列存在一个碱基的差异,且这一碱基的不同会导致 CST3 蛋白质序列的一个氨基酸改变。由核苷酸序列比对可知,这个差异碱基位点恰好对应的是人 *Cst3* 基因中的一个 SNP 位点 rs1428071266,这提示长爪沙鼠中的这个差异位点可能是一个 SNP 位点。但是,目前尚无关于该位点功能的报道。

我们将密码子优化的 CST3 蛋白编码序列插入 *pET28a* 蛋白表达载体中构建了重组长爪沙鼠 CST3 蛋白表达质粒,并将该质粒转入到大肠杆菌原核表达系统中,通过 IPTG 诱导获得分子量大约为 15 kDa N 端携带 6X His 标签的重组长爪沙鼠 CST3 蛋

白。但是诱导后获得的高效表达的 CST3 蛋白主要以包涵体形式存在,普通的镍柱层析纯化方法只能获得很少的可溶性长爪沙鼠 CST3 蛋白^[21],不足以进行后期抗体制备等实验。因此,后续若进行蛋白制备,可考虑用变剂溶解,纯化复性后获得 CST3 蛋白,以用于抗体制备和进一步研究。综上所述,本研究对长爪沙鼠 *Cst3* 基因序列同源性进行了分析,并成功构建了重组 CST3 蛋白表达载体,为长爪沙鼠 *Cst3* 基因功能研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李长龙,杜小燕,郭萌,等.长爪沙鼠模型群体的培育[J].实验动物科学,2016,**33**(3):52-55.
- [2] Zorio D A R, Monsma S, Sanes D H, *et al.* De novo sequencing and initial annotation of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) genome[J]. Genomics, 2018, S0888-7543 (17) 30161-1.
- [3] Fujisawa N, Maeda Y, Yamamoto Y, *et al.* Newly established low seizure susceptible and seizure-prone inbred strains of Mongolian gerbil[J]. Exp Anim, 2003, **52**(2):169-172.
- [4] Li X, Lu J, Wang Y, *et al.* Establishment and Characterization of a Newly Established Diabetic Gerbil Line[J]. PLOS ONE, 2016,**11**(7):e159420.
- [5] Du X, Wang D, Li Y, *et al.* Newly breeding an inbred strain of ischemia-prone Mongolian gerbils and its reproduction and genetic characteristics[J]. Exp Anim, 2018, **67**(1):83-90.
- [6] Li Z, Huo X, Zhang S, *et al.* Selection of Genes Associated with Variations in the Circle of Willis in Gerbils Using Suppression Subtractive Hybridization [J]. PLOS ONE, 2015, **10**(5):e127355.
- [7] Szpadarska A M, Frankfater A. An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer[J]. Cancer Res,2001,**61**(8):3493-3500.
- [8] Premzl A, Zavašnik-Bergant V, Turk V, *et al.* Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro [J]. Experimental Cell Research, 2003, **283**(2):206-214.
- [9] Xu Y, Schnorrer P, Proietti A, *et al.* Regulatory Factor 8 Expression Inflammation through Regulation of IFN Blood Concentration in Response to IL-10 Controls Cystatin C Synthesis and blood concentration in response to inflammation through regulation of IFN regulatory factor 8 expression[J]. The Journal of Immunology, 2011,**186**(6):3666-3673.
- [10] 朱旭,郑利平,杨兰,等.胱抑素 C 及其基因多态性与广西地区壮族人群冠心病的相关性[J].检验医学与临床,2018,**15**(3):293-296.
- [11] 何琳莉,蹇顺海,文彬. cathepsin B 与 cystatin C 在青年及老年人胃癌发生、发展中的意义[J].临床与实验病理学杂志,

- 2016, **32**(4):380-383.
- [12] 王梦茹,张源明. 血清胱抑素 C 与高血压关系研究进展[J]. 海南医学,2018, **29**(4):513-516.
- [13] Mathews P M, Levy E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease[J]. Ageing Research Reviews, 2016, **32**:38-50.
- [14] Leto G, Crescimanno M, Flandina C. On the role of cystatin C in cancer progression[J]. Life Sciences, 2018, **202**:152-160.
- [15] Yang S, Song L, Zhao L, *et al.* Predictive value of cystatin C in people with suspected or established coronary artery disease: A meta-analysis[J]. Atherosclerosis, 2017, **263**:60-67.
- [16] 张学德,侯彦丽,牛泽群,等. 检测肺癌患者血清 Cathepsin X 及 Cystatin C 的临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2013, (8): 411-416.
- [17] Hooton H, Dubern B, Henegar C A, *et al.* Ssocation between CST3 rs2424577 Polymorphism and Corpulence Related Phenotypes during Lifetime in Populations of European Ancestry [J]. Obes Facts. 2011, **4**(2):131-44.
- [18] Magnusson M, Molvin J, Engström G, *et al.* Cystatin C and Risk of Diabetes and the Metabolic Syndrome-Biomarker and Genotype Association Analyses[J]. PLoS One, 2016, **11**(5):e0155735.
- [19] Li J, Wei J, Xu P, *et al.* Impact of diabetes-related gene polymorphisms on the clinical characteristics of type 2 diabetes Chinese Han population [J]. Oncotarget, 2016, **7**(51): 85464-85471.
- [20] Hua Y, Zhao H, Lu X, *et al.* Meta-Analysis of the Cystatin C (CST3) Gene G73A Polymorphism and Susceptibility to Alzheimer's Disease[J]. Int J Neurosci, 2012, **122**(8):431-438.
- [21] 陈颖,沈敏,刘宝林. 包涵体蛋白纯化方法的探讨[J].放射免疫学杂志, 2011, **24**(1):62-64.

Homology Analysis and Prokaryotic Expression of *Mongolian Gerbil* CST3

WANG Yan, GUO Meng, DU Xiaoyan, LI Changlong, LU Jing, HUO Xueyun,

LÜ Jingyi, LIU Xin, CHEN Zhenwen

(School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To analyze the sequence homology of CST3 and establish a prokaryotic expression system of CST3 protein *in vitro* for producing anti-*Mongolian gerbil* Cystatin C (CST3) antibodies and perform function studies in future. **Method** After cloning and homology analysis, the condon optimization of *Cst3* cDNA sequences of *Mongolian gerbils* were conducted. The recombinant CST3 protein expression vector was constructed by inserting the optimized sequences into *pET28a* vectors, which were then transformed into competent cells. The prokaryotic expression of CST3 protein was induced by Isopropyl β -D-Thiogalactoside (IPTG) and verified by SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blotting. **Result** Both nucleotide and amino acid sequences of CST3 in *Mongolian gerbils* displayed low identity with human or mice CST3. After codon optimization, the *Cst3* expression sequences of *Mongolian gerbils* were inserted into the *pET28a* plasmids, and a large amount of CST3 protein was obtained after induced expression with 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 12 h as an optimized condition. **Conclusion** We successfully established a prokaryotic expression system of CST3 protein *in vitro*.

Key words: *Mongolian gerbils*; CST3; prokaryotic expression