

牙鲆 NPY 的体外表达及体内检测

王 倩^{1,2}, 谭训刚¹, 孙 威¹, 尤 锋¹, 张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要: 神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 被普遍认为是一种重要的促食因子, 在调节鱼类的摄食行为方面起着至关重要的作用。为进一步研究牙鲆 NPY 蛋白的生物学功能, 作者克隆了牙鲆 NPY 成熟肽序列 (*m-NPY*) 及含有信号肽的全长序列 (*f-NPY*), 利用原核表达系统分别进行体外重组表达, 筛选出诱导剂 IPTG 最佳诱导浓度为 0.8 mmol/L 及最佳诱导时间 3 h; 此外, 根据牙鲆 NPY 第 49-64 位氨基酸序列制备了多克隆抗体并通过 Western blot 验证该多抗能够有效检验重组 NPY 及牙鲆体内 NPY 的表达。研究结果为研究重组牙鲆 NPY 蛋白在牙鲆水产养殖产业中的应用及检测提供了依据。

关键词: 神经肽 Y; 原核表达; 重组蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)04-0015-05

doi: 10.11759/hyxx20130424003

神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 与结构肽 YY (peptide YY, PYY)、胰多肽 (pancreatic polypeptide, PP) 相似, 被认为属于胰多肽家族^[1]。NPY 广泛存在于各种脊椎动物中, 多由 36 个氨基酸组成, 且物种间高度保守^[2]。NPY 主要分布于中枢神经系统及外周神经系统中, 尤其在脑部含量很高。NPY 以信号分子的形式参与到体内多种生理调节过程如血压调节、交感神经系统节律、昼夜节律及摄食等^[3]。金鱼 (*Carassius auratus*) 中, 侧脑室内注射 NPY 可显著提高摄食量, 而加入 NPY 受体拮抗物可降低这种效应; 禁食能够引起 NPY 表达量的上升^[4]。在其他鱼类中如大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、银大马哈鱼 (*O. kisutch*)、斑叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、冬鲷 (*Raja ocellata*)、巴南牙鲆 (*Paralichthys orbignyanus*) 等中也发现禁食会使下丘脑中 NPY mRNA 的表达量增加^[5-8]。通过腹腔注射将重组的 NPY 蛋白注射到罗非鱼 (*Oreochromis sp.*) 中, 可以促进其摄食量及体质量的增加^[9]。因此 NPY 被认为是一种十分重要的摄食调控因子, 在调节鱼类的摄食行为方面起着至关重要的作用。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是中国重要的海水养殖鱼类之一, 生长率是养殖的重要指标之一, NPY 的促进摄食作用可对提高牙鲆的生长率有重要意义。但是目前有关牙鲆 NPY 生物学功能的研究主要集中在 RNA 水平^[8, 10-12], 蛋白水平的研究还未见报道。为进一步研究牙鲆 NPY 的生物学作用, 本实验在克隆牙鲆

NPY 基因的基础上, 构建 NPY 原核表达质粒并进行体外原核表达; 根据牙鲆 NPY 蛋白序列制备了 NPY 多克隆抗体, 可有效地检验牙鲆内源 NPY, 从而为进一步研究牙鲆 NPY 蛋白的生物学功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂及抗体

限制性内切酶 (TaKaRa, 大连), T4 Ligase (Promega, 美国), *Pfu* DNA 聚合酶 (天根, 北京), 超低分子量蛋白质标准 (Solarbio, 北京), Anti-His 抗体 (天根, 北京), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (中杉金桥, 北京), 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (中杉金桥, 北京)。

大肠杆菌 BL-21 (DE3) 及质粒 pPROEX™ HTa 由本实验室保存。

1.2 NPY 表达载体的构建

根据 NCBI 数据库中公布的牙鲆 NPY cDNA 序

收稿日期: 2013-04-24; 修回日期: 2013-10-16

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2012AA092203); 国家自然科学基金资助项目 (31128017); 国家科技基础条件平台建设运行项目-水产种质资源平台运行服务 (2006DKA30470017)

作者简介: 王倩 (1987-), 女, 山东曲阜人, 博士生, 主要从事海洋生物学研究, 电话: 0532-82898559, E-mail: amelixing@163.com; 谭训刚, 通信作者, 副研究员, 电话: 0532-82898559, E-mail: tanx@qdio.ac.cn; 尤锋, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898561, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

列(GenBank 登录号: AB055211.1), 分别设计全长 *NPY(f-NPY)*及成熟肽 *NPY(m-NPY)*的引物(表 1), 其中 *m-NPY* 的上游引物在 5'端根据 Kozak 规则加入 ACCATGGGA, 以提高转录和翻译效率, 下游引物在 5'端加入 TCA 进行翻译的终止。使用 *Pfu* 高保真酶扩增目的片段, 插入 pPROEX™ HTa 质粒的 *Nco* I 酶切位点并转化大肠杆菌 BL-21(DE3), 经 LB+Amp 培养基筛选阳性菌落, 提取质粒后分别以 *f-NPY-F/R* 和 *m-NPY-F/R* 为引物进行 PCR 鉴定并进行测序, 筛选到编码框正确的阳性重组菌分别命名为 *f-NPY/HTa*、*m-NPY/HTa*。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of primers

引物名称	引物序列
<i>f-NPY-F</i>	5'-ATGCATCCTAACTTGGTGAG -3'
<i>f-NPY-R</i>	5'-GCAGTGATGTGGATTCAACGTTGATTGC -3'
<i>m-NPY-F</i>	5'-ACCATGGGATACCCGGTGAAACCGGAGA- ACCC -3'
<i>m-NPY-R</i>	5'-TCAATACCTCTGTCTTGTGATG-3'

1.3 NPY 重组蛋白的诱导表达及条件优化

挑取 *f-NPY/HTa*、*m-NPY/HTa* 单菌落于 5 mL LB+Amp 培养基中 37°C、200 r/min 过夜培养, 次日以 1%的接种量接于 50 mL LB+Amp 培养基中继续培养至 A_{600} 达到 0.8, 此时取出 1 mL 培养液作为对照样品 T_0 , 然后向剩余培养基中加入诱导剂 IPTG 诱导重组蛋白的表达。

为确定诱导剂浓度对重组蛋白表达的影响, 设定 IPTG 浓度分别为 0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 和 3.0 mol/L, 培养 3 h 后进行取样。为确定诱导时间对重组蛋白表达量的影响, 固定 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L, *f-NPY* 取样时间为分别为诱导后 1、2、3、4 和 5 h; *m-NPY* 取样时间设置为诱导后 3 h 和 4 h。

将样品在 6000 rpm 离心 5 min 后弃上清, 用 50 μ L PBS 和 50 μ L 2 \times SDS-PAGE 样品缓冲液重悬菌体, 煮沸 5 min 后进行 SDS-PAGE 检测。*f-NPY* 所用分离胶浓度为 16%, 使用考马斯亮蓝 R-250 进行染色; *m-NPY* 使用分离胶浓度为 20%的 Tricine-SDS-PAGE, 并使用考马斯亮蓝 G-250 进行染色。

1.4 Western blot 分析

为进一步确认 NPY 重组蛋白的表达, 作者利用 His 表达标签进行 Western blot 分析。蛋白样品由 SDS-PAGE 胶转至硝酸纤维素滤膜, 以浓度为 5%的

脱脂奶粉进行封闭, 然后加入 1 : 1000 稀释的 Anti-His 抗体作为一抗室温孵育 1 h, PBST 洗 3x 5 min 后, 加入 1 : 1000 稀释的羊抗鼠二抗室温孵育 1 h, PBST 洗 3x 5 min 后用新鲜配制的 DAB 显色液(0.2 g/L DAB, 0.1% H₂O₂)进行显色。

1.5 NPY 多克隆抗体检测牙鲆内源 NPY 蛋白

牙鲆多克隆抗体由天津赛尔生物技术有限公司合成, 多肽抗原序列为 YSALRHYINLITRQRY, 是牙鲆 NPY 的第 49~64 位氨基酸, 位于胰多肽超家族(PAH superfamily)结构域内。为检测该抗体的有效性, 作者取 100 尾 24 hph (孵化后 24 h) 的牙鲆仔鱼, 加入 50 μ L PBS 和 50 μ L 2 \times SDS-PAGE 样品缓冲液煮沸 5 min, 即可作为样品与 *m-NPY* 诱导蛋白一起进行 Western blot 检测。方法同 1.4, 其中一抗为 1 : 500 稀释的 NPY 多克隆抗体, 二抗为 1 : 1000 稀释的羊抗兔抗体。另外, 以 1 : 1000 稀释的 Anti-His 抗体为一抗检测 *m-NPY* 诱导样品作为阳性对照。

2 结果

2.1 NPY 表达载体构建

使用 *Pfu* 高保真酶扩增得到与预期大小相符的 PCR 片段, PCR 产物回收后插入 pPROEX™ HTa 质粒的 *Nco* I 酶切位点, 阳性重组质粒分别以 *f-NPY-F/R* 和 *m-NPY-F/R* 为引物进行 PCR 扩增, 可以检验出各自的 NPY 条带(图 1), 测序结果也表明克隆得到的为预期条带, 插入方向正确且编码框没有发生改变, 即成功获得 NPY 重组表达菌 *f-NPY/HTa*、*m-NPY/HTa*。

重组质粒插入的 *f-NPY* 为 336 bp, 可编码 100 个

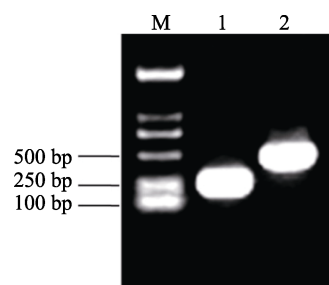


图 1 重组表达质粒 *m-NPY/HTa*、*f-NPY/HTa* 的鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant expression plasmid *m-NPY/Hta* and *f-NPY/Hta*

M. DNA marker; 1. *m-NPY/HTa* 的 PCR 检测条带; 2. *f-NPY/HTa* 的 PCR 检测条带

M. DNA marker; 1. PCR identification of *m-NPY/HTa*; 2. PCR identification of *f-NPY/HTa*

氨基酸, 加上 pPROEX™ HTa 质粒的融合标签, 融合蛋白的分子量理论值为 14 kDa; *m-NPY* 为 120 bp, 可编码 40 个氨基酸, 加上 pPROEX™ HTa 质粒的融合标签, 融合蛋白的分子量理论值为 7 kDa。

2.2 NPY 重组蛋白的诱导表达及条件优化

全长 NPY 重组蛋白 f-NPY 及成熟肽 NPY 重组蛋白 m-NPY 在 *E.coli* BL21 (DE3) 中表达为带有组氨酸标签的融合蛋白, 实验发现在 0.8 mmol/L IPTG、37°C 条件下经过 IPTG 诱导后, f-NPY 重组蛋白很快产生, 而对照样品没有该蛋白条带。随着诱导时间的延长, 重组蛋白的量不断增加, 到 3 h 时, 重组蛋白表达量达到最大, 此后进入平台期。因此将诱导时间定为 3 h (图 2a)。在优化 f-NPY 诱导时间的基础上, 设定了 m-NPY 诱导时间点为 3 h 和 4 h, 实验发现两个取样点 m-NPY 的表达量没有明显变化, 因此同样将诱导时间定为 3 h (图 3a)。当培养温度为 37°C, 诱导时间为 3 h 时, 随着 IPTG 浓度改变, f-NPY 和 m-NPY 重组蛋白表达量变化均不明显 (图 2b, 图 3b), 因此采用较小浓度 0.8 mmol/L 作为表达的最佳诱导浓度。此外, Western blot 以 Anti-His 鼠单克隆抗体为一抗, 结果显示预期大小处有单一条带显色, 进一步确定了含有组氨酸标签的重组蛋白的表达 (图 2c, 图 3c)。

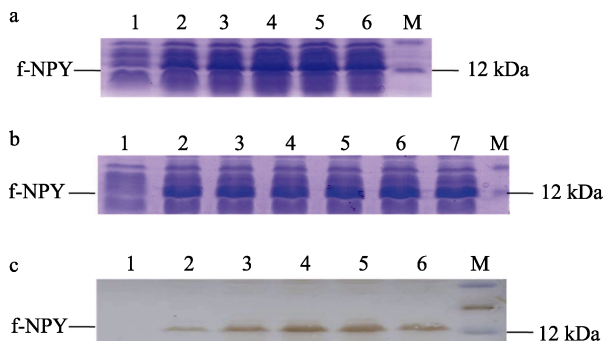


图 2 SDS-PAGE 及 Western blot 检测 f-NPY 重组蛋白的最佳表达条件

Fig. 2 SDS-PAGE and western blot analysis of the optimal conditions for expression of recombinant f-NPY
 a. 诱导时间对 f-NPY 蛋白表达量的影响。1. 对照样品 (T_0); 2-6. 诱导时间分别为 1, 2, 3, 4, 5 h; M. 蛋白 Marker; b. IPTG 浓度对 f-NPY 蛋白表达量的影响。1. 对照样品 (T_0); 2-7. IPTG 浓度分别为 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 和 3.0 mmol/L; M. 蛋白 Marker; c. Western blot 检测 f-NPY 重组蛋白最佳诱导时间。顺序同 a
 a. The effect of induction time on the expression of f-NPY. 1. uninduced control (T_0); 2-6. The induction time of expression were 1, 2, 3, 4, 5 h, respectively; M. protein marker; b. The effect of IPTG concentration on the expression of f-NPY. 1. uninduced control; 2-7. IPTG concentrations were 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mmol/L, respectively; M. protein marker; c. western blot analysis of a

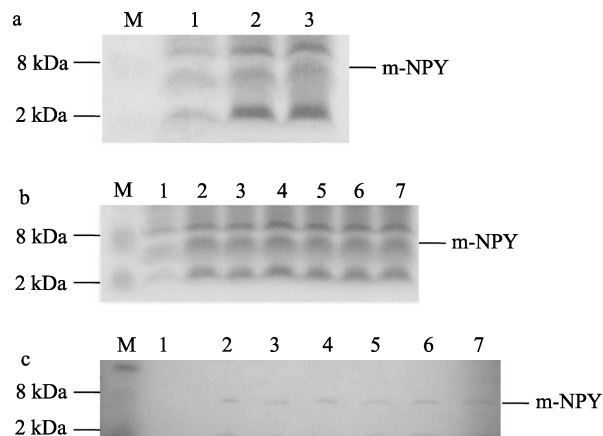


图 3 SDS-PAGE 及 Western blot 检测 m-NPY 重组蛋白的最佳表达条件

Fig. 3 SDS-PAGE and western blot analysis of the optimal conditions for expression of recombinant m-NPY

a. 诱导时间对 m-NPY 蛋白表达量的影响; M. 蛋白 Marker; 1. 对照样品 (T_0); 2. 3 h; 3. 4 h; b. IPTG 浓度对 m-NPY 蛋白表达量的影响; M. 蛋白 Marker; 1. 对照样品 (T_0); 2-7. IPTG 浓度分别为 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 和 3.0 mmol/L; c. Western blot 检测 m-NPY 重组蛋白最佳诱导时间; 顺序同 b
 a. The effect of induction time on the expression of m-NPY. M. protein marker; 1. uninduced control (T_0); 2. 3 h, 3. 4 h; b. The effect of IPTG concentration on the expression of m-NPY; M. protein marker; 1. uninduced control; 2-7. IPTG concentrations were 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0, respectively; c. Western blot analysis of b

2.3 牙鲆内源 NPY 蛋白的检测

为分析牙鲆体内 NPY 的表达, 作者根据 NPY 的部分氨基酸序列合成了多克隆抗体。实验表明该抗体可以检测到牙鲆仔鱼样品的 NPY 表达 (图 4)。牙鲆 NPY 蛋白的理论分子量约为 4 kDa, 比实验中 m-NPY 重组蛋白略小, Western blot 结果显示合成的

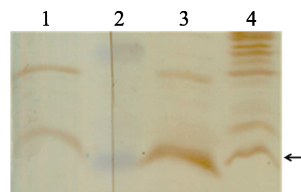


图 4 多克隆抗体检测牙鲆内源 NPY 表达

Fig. 4 Western blot analysis of the endogenous flounder NPY with the polyclonal antibody

1. 重组 m-NPY 蛋白, 一抗为 anti-His 抗体; 2. 蛋白 Marker; 3. 重组 m-NPY 蛋白, 一抗为 anti-NPY 多抗; 4. 牙鲆内源 NPY 蛋白, 一抗为 anti-NPY 多抗, 箭头所指为检测到的 NPY 条带
 1. the recombinant m-NPY with anti-His antibody as the primary antibody; 2. protein marker; 3. the recombinant m-NPY with anti-NPY polyclonal antibody as the primary antibody; 4. the endogenous flounder NPY with anti-NPY serum as the primary antibody and the arrow indicated the endogenous NPY

多抗可以在牙鲆仔鱼样品中检测到约 4 kDa 大小的条带, 该条带与两种抗体处理的 m-NPY 大小接近。因此作者推论该合成的 NPY 多克隆抗体可以检测出内源表达的 NPY 蛋白。

3 讨论与结论

以往的研究表明, 牙鲆 NPY 蛋白的组成包括 28 个氨基酸的预测信号肽、36 个氨基酸的成熟肽及 32 个氨基酸的 C 端延伸, 其成熟肽含有甘氨酸-赖氨酸-精氨酸加工位点, 与其他鱼类的 NPY 有较高的保守性(鲈鱼, 97.2%; 斑马鱼, 94.4%; 金鱼, 91.7%)^[10]。本研究分别克隆了牙鲆 NPY 两种不同形式的基因片段, 全长 *NPY(f-NPY)* 及成熟肽 *NPY(m-NPY)*, 与 NCBI 数据库中已有序列进行比对, 一致性均为 100%, 并发现含有胰多肽超家族(PAH superfamily) 结构域。将 *f-NPY* 及 *m-NPY* 分别插入到表达质粒 pPRO^{EX} HTa 的 6xHis 标签之后, 利用大肠杆菌表达菌株 BL 21(DE3) 获得重组蛋白。然后对重组蛋白的诱导条件进行了优化, 重组蛋白表达量的多少与诱导剂的浓度和诱导时间有密切关系, 而本实验发现在选取的范围内, 诱导剂浓度的变化对重组蛋白表达量的影响并不明显, 主要影响因素是诱导时间。本实验最终确定了 IPTG 诱导浓度为 0.8 mmol/L, 诱导时间为 3 h, 为重组蛋白的大量培养表达提供了依据。

研究表明 NPY 促食的机制可能是其在室旁核中与 Y1^[13] 或 Y5^[14] 受体结合后传出信号, 抑制交感神经兴奋副交感神经, 并促进生长激素、促性腺激素^[15]、促黄体生成素^[16] 等激素的释放, 从而增加食欲和采食量并促进消化^[17]。目前许多鱼类物种中都克隆出了 NPY 并且验证了其促食作用, 因而 NPY 在促进水产养殖业发展中有可观的前景。在牙鲆中的研究还仅限于核酸水平, 而在机体内真正起作用的是蛋白。本实验得到 NPY 重组蛋白, 并制备了多克隆抗体, 为在牙鲆中进一步研究其生物学功能提供了条件。

参考文献:

- [1] Tatemoto K. Neuropeptide Y. Complete amino-acid-sequence of the brain peptide[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1982, 79(18): 5485-5489.
- [2] Hoyle C H V. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives[J]. Brain Research, 1999, 848(1-2): 1-25.
- [3] Larhammar D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Regulatory Peptides, 1996, 62(1): 1-11.
- [4] Lopez-Patino M A. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. European Journal of Pharmacology, 1999, 377(2-3): 147-153.
- [5] Silverstein J T. Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 110(2): 157-165.
- [6] Silverstein J T, Plisetskaya E M. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish[J]. American Zoologist, 2000, 40(2): 296-308.
- [7] Mac Donald E, Volkoff H. Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting[J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 161(2): 252-261.
- [8] Campos V F. Identification, tissue distribution and evaluation of brain neuropeptide Y gene expression in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*[J]. Journal of Biosciences, 2010, 35(3): 405-413.
- [9] Carpio Y. Cloning, expression and growth promoting action of Red tilapia (*Oreochromis* sp.) neuropeptide Y[J]. Peptides, 2006, 27(4): 710-718.
- [10] Kurokawa T, Suzuki T. Development of neuropeptide Y-related peptides in the digestive organs during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 126(1): 30-38.
- [11] Volkoff H. Aspects of the hormonal regulation of appetite in fish with emphasis on goldfish, Atlantic cod and winter flounder: Notes on actions and responses to nutritional, environmental and reproductive changes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, 2009, 153(1): 8-12.
- [12] Campos V F. Neuropeptide Y gene expression around meal time in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(2): 227-232.
- [13] Zukowska-Grojec Z. Neuropeptide Y: an adrenergic

- cotransmitter, vasoconstrictor, and a nerve-derived vascular growth factor[J]. *Adv Pharmacol*, 1998, 42: 125-128.
- [14] Flynn M C. Feeding response to neuropeptide Y-related compounds in rats treated with Y5 receptor antisense or sense phosphothio-oligodeoxynucleotide[J]. *Physiol Behav*, 1999, 66(5): 881-884.
- [15] Peng C. Neuropeptide Y stimulates growth-hormone and gonadotropin-Li secretion in the goldfish pituitary - involvement of both presynaptic and pituitary cell actions[J]. *Endocrinology*, 1993, 132(4): 1820-1829.
- [16] Cerda-Reverter J M. Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 1999, 277(6): 1627-1634.
- [17] Mccarthy H D. Megestrol-acetate stimulates food and water-intake in the rat effects on regional hypothalamic neuropeptide-Y concentrations[J]. *European Journal of Pharmacology*, 1994, 265(1-2): 99-102.

Expression of recombinant flounder NPY protein *in vitro* and detection of endogenous NPY in flounder

WANG Qian^{1, 2}, TAN Xun-gang¹, SUN Wei¹, YOU Feng¹, ZHANG Pei-jun¹

(1. Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Received: Apr., 24, 2013

Key words: Neuropeptide Y; prokaryotic expression; recombinant protein; polyclonal antibody

Abstract: Neuropeptide Y (NPY) plays a key role in regulation of food intake in fish, which is essential for aquaculture. In order to investigate the effects of NPY on olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), two types of flounder NPY gene, full length NPY (*f-NPY*) with signal peptide and mature peptide NPY (*m-NPY*) without the signal, were cloned into expression vector pPROEXTM HTa and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) respectively. The recombinant NPY proteins were induced by IPTG. The optimal concentration of IPTG was 0.8 mmol/L and the optimal induction time was 3 h. In addition, the NPY polyclonal antibody was prepared according to its amino acid sequence. Western blot analysis confirmed that both the recombinant NPY and the flounder endogenous NPY protein could be detected by the polyclonal antibody. In summary, our study will provide basis for further study on the application of recombinant olive flounder NPY in aquaculture.

(本文编辑: 谭雪静)