

鳊(*Siniperca chuatsi*)生长激素基因克隆 和原核表达*

刘臻¹ 罗小华^{1,2} 鲁双庆¹ 谢帝芝^{1,2} 房志家¹ 肖克宇²

(1. 长沙学院生物工程与环境科学系 长沙 410003; 2. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128)

提要 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术,从鳊脑垂体总 RNA 中扩增长激素(GH)成熟肽基因,将成熟生长激素的 cDNA 定向克隆到表达载体 pET-32a(+),并转入大肠杆菌 BL21(DE3)中。结果表明,鳊生长激素(GH)基因含开放阅读框(ORF)615 个核苷酸,编码 204 个氨基酸,蛋白分子量为 23kDa,等电点为 7.07,其中酸性氨基酸占 10.78%,碱性氨基酸占 12.74%,疏水氨基酸为占 44.12%,极性氨基酸占 32.35%。在 IPTG 终浓度 1.0mmol/L、温度 37 和培养时间 4h 的最佳诱导表达条件下,鳊生长激素基因(GH)在大肠杆菌中获得高效表达,重组菌体裂解物经 SDS-PAGE 可检测到分子量约为 43kDa 的鳊生长激素与硫氧还蛋白(Thioredoxni, Trx)融合蛋白,其表达量约占菌体总蛋白 58%。Western 印迹分析也证实含 6×His 标签的重组融合蛋白能够很好地与抗 6×His 单抗发生反应。本研究为下一步鳊生长激素基因(GH)的生物学功能及应用奠定了基础。

关键词 鳊,生长激素,基因克隆,原核表达

中图分类号 Q953

生长激素(growth hormone, GH)是脊椎动物脑垂体细胞合成和分泌的一种单链多肽激素,与催乳素(prolactin, PRL)和胎盘催乳素(placental lactogen, PL)同属一个基因家族,是影响动物生长性状的主效基因。鱼类生长激素基因除能促进鱼体生长发育外,还具有广泛的生理功能,能促进肌肉中的蛋白质合成,加速鱼类骨骼的纵向生长(Forsyth *et al.*, 2002),提高饵料转化效率,促进鱼类性成熟,调节体内渗透压,增强鱼体对高盐环境的适应能力等重要作用(Cavari *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1994)。基因工程技术的发展实现了重组鱼类 GH 体外高效表达生产。目前,鱼类生长激素基因已被广泛的研究,上百种鱼类的 GH 基因和 cDNA 序列相继被分离和克隆,其中许多种类已在微生物或动植物细胞中高效表达,并表现出明显促生长活性(刘顺梅等, 2007; Li *et al.*, 2003; Zang *et al.*, 2007)。本研究拟采用 RT-PCR 方法克隆鳊(*Siniperca*

chuatsi)生长激素基因,并构建了生长激素基因原核表达系统,为进一步研究鳊 GH 的生物学功能及应用奠定了基础,用于探讨重组鳊 GH 对养殖鱼类的促生长效果和利用重组鳊生长激素开发鱼用饲料添加剂的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、菌株、质粒 鳊(*Siniperca chuatsi*)由湖南农业大学水产养殖基地提供;菌株 *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)、质粒 pET-32a(+)由本实验室保存;pUCm-T 购自上海生工生物工程有限公司。

1.1.2 试剂及酶 Trizol 购于 in vitro 公司;Taq 酶、T₄ DNA 连接酶、dNTP、逆转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;限制性内切酶购自大连宝生物工程公司;DNA 凝胶

* 湖南省高等学校科学研究项目(重点项目), 08A007 号; 湖南省高等学校科学研究项目(优秀青年项目), 09B011 号; 长沙市科技局重点项目, K070728—31 号; 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目, 284 号。刘臻, 讲师, 博士研究生, E-mail: lshqlzh@163.com

通讯作者: 鲁双庆, 教授, 博士生导师, E-mail: lshqlzh@163.com

收稿日期: 2009-04-15, 收修改稿日期: 2009-06-18

回收试剂盒购自 TIANGEN; 抗 6-His 标签单抗, BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司; 碱性磷酸酯酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 根据 GeneBank 中大眼鳊的生长激素基因序列(AY155227)设计鳊生长激素的一对引物 G1、G2, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。为便于基因的克隆及构建表达载体等后续工作, 在引物中引入了 *EcoR* 和 *HindIII* 的酶切位点(以下划线表示)。

G1 5'-GCGAATTCATGGACAGAGTTGTCCTCCT-3'
G2 5'-GCAAGCTTCTACAAGGTGCAGTTGGCT-3'

1.2.2 鳊生长激素 cDNA 的克隆及序列分析 鳊脑垂体总 RNA 提取按照 Trizol 试剂盒说明书进行。第一链 cDNA 的合成也按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。然后以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。在 25 μ l 的 PCR 体系中 ddH₂O 16 μ l, 10 \times Taq Buffer 2.5 μ l, 25mmol/L Mg²⁺ 2.5 μ l, 10mmol/L dNTP 1 μ l, 引物 G1、G2 各 0.5 μ l, 模板 1 μ l, Taq 酶 1 μ l。PCR 程序设定: 94 预变性 5min, 1 个周期; 94 变性 30s; 56 退火 30s, 72 延伸 45s, 循环 30 个周期; 最后 72 延伸 10min。取 5 μ l PCR 产物电泳检测。

用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物中的目的片段(操作见试剂盒说明书), 参照分子克隆实验指南(Sambrook *et al.*, 1989), 采用 T-A 克隆法, 构建克隆载体 pUCm-GH。将此克隆载体转化大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑和菌落 PCR 法初步鉴定后, 送可能的阳性克隆子到上海生工生物工程技术有限公司测序, 用 DNA 软件分析测序结果。

1.2.3 重组 GH 原核表达载体的构建 测序正确后, 筛选正确的克隆。用碱裂解法快速抽提重组质粒 pUCm-GH, 以 pUCm-GH 质粒为模板, 用引物 G1、G2, 进行 PCR 扩增。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 GH-DNA 片段。用 *EcoR* 和 *HindIII* 分别对 GH-DNA 片段和原核表达载体 pET-32a(+)进行双酶切, 割胶回收目的片段后按适当比例进行连接, 并转化至大肠杆菌 BL21(DE3) (Beardmore, 1997)。碱裂解法快速抽提质粒, *EcoR*、*HindIII* 双酶切初步鉴定, 测序证实已插入鳊 GH-cDNA 片段, 将重组原核表达载体命名

为 pET-ScGH。

1.2.4 重组 GH 在大肠杆菌中的表达 分别挑取含有重组质粒 pET-scGH 和原核表达质粒 pET-32a(+)的 BL21(DE3)菌株接种于含有氨苄青霉素(Amp)的 LB 液体培养基中, 在 37 摇床振荡培养过夜, 第二天再以 1:100—1:50 的比例接种于同样成分的新鲜 LB 液体培养基, 37 振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.8—1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L 继续培养 4h 进行诱导表达(Liu *et al.*, 1990; 伍翠芬等, 2004)。培养结束后离心收集菌体, 加 PBS 缓冲液重悬菌体, 冰上超声波破碎。菌体超声裂解物于 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 10min, 分离沉淀和上清, 沉淀再用 PBS 重悬。分别取上清和沉淀, 加入等量 2 \times 上样缓冲液混合后沸水煮 5min, 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析(孙效文等, 2002)。

1.2.5 Western 印迹分析 诱导表达产物经 SDS-PAGE 后, 按夹板(正极)、海绵垫、滤纸(3 层)、PVDF 膜、蛋白质凝胶、滤纸(3 层)、海绵垫、夹板(负极)的顺序组装蛋白质转移夹心, 然后 280mA 稳流转移 2h。电转移完成后, 将 PVDF 膜标记好, 用封闭缓冲液[10mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 140mmol/L NaCl, 0.1% (V/V) Tween-20, 5% Dry milk powder]封闭 2—4h, 然后用 1:800 的一抗稀释液(一抗为小鼠 Anti-His Tag 单克隆抗体)将 PVDF 膜封闭在塑料薄膜袋中, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜; 去掉一抗溶液, 用 TBS-Tween [10mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 140mmol/L NaCl, 0.1% (V/V) Tween-20]洗涤 PVDF 膜 4 次; 加入 1:1000 的二抗稀释液[二抗为 AP 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L), AP-labeled Goat Anti-Mouse IgG(H+L)], 室温反应 1h; 用 TBS-Tween 洗涤膜 3 次, 最后用 TBS 洗一次, 将 PVDF 膜浸没在 BCIP/NBT 底物反应溶液中, 轻轻摇动, 直到蛋白质带明显出现时为止(丁洁等, 2006)。当蛋白质带清晰出现时, 去掉底物反应液, 加入 ddH₂O 终止反应。

2 结果与分析

2.1 鳊生长激素基因的克隆和序列分析

将 PCR 产物纯化后与 pUCm-T 载体连接转化大肠杆菌 DH5 α , 经测序, DNASTar 软件分析获得鳊 GH-cDNA 开放阅读框(ORF)的完整核苷酸序列及其推导的氨基酸序列(图 1 和表 1) (阎晓宇, 2005)¹⁾。结果显示: 鳊生长激素基因的开放阅读框(ORF) 序列与

1) 阎晓宇, 2005. 中华按蚊防御素基因的克隆、表达及重组蛋白的纯化与生物活性的初步评价. 广州: 第一军医大学硕士学位论文

```

1   ATG GAC AGA GTT GTC CTC CTG CTG TCG GTG GTG TCT CTG
1   M   D   R   V   V   L   L   L   S   V   V   S   L
40  GGC GTC TCC TCT CAA CCA ATC ACA GAC AGC CAG CGT CTG
14  G   V   S   S   Q   P   I   T   D   S   Q   R   L
79  TTC TCC ATA GCT GTC AGC AGA GTT CAA CAC CTC CAC CTG
27  F   S   I   A   V   S   R   V   Q   H   L   H   L
118 CTC GCT CAG AGA CTC TTC TCT GAC TTC GAG AGC TCT CTG
40  L   A   Q   R   L   F   S   D   F   E   S   S   L
157 CAG ACG GAG GAG CAG CGT CAA CTC AAC AAA ATC TTC CTG
53  Q   T   E   E   Q   R   Q   L   N   K   I   F   L
196 CAG GAT TTC TGC AAC TCT GAT TAC ATC ATC AGC CCC ATC
66  Q   D   F   C   N   S   D   Y   I   I   S   P   I
235 GAC AAG CAC GAG ACA CAA CGC AGC TCT GTT CTG AAG CTG
79  D   K   H   E   T   Q   R   S   S   V   L   K   L
274 TTG TCT ATC TCC TAT CGA TTG GTT GAG TCT TGG GAG TTT
92  L   S   I   S   Y   R   L   V   E   S   W   E   F
313 CCC AGT CGT TCT CTG TCT GGA GGT TCT GCT CCG AGG AAC
105 P   S   R   S   L   S   G   G   S   A   P   R   N
352 CAG ATT TCA CCC AAA CTC TCG GAA CTG AAG ACG GGA ATC
118 Q   I   S   P   K   L   S   E   L   K   T   G   I
391 CTG CTG TTG ATC AGG GCC AAT CAG GAC GGA GCC GAG ATC
131 L   L   L   I   R   A   N   Q   D   G   A   E   I
430 TTC CCT GAT AGC TCC GCC CTG CAG CTG GCT CCT TAT GGG
144 F   P   D   S   S   A   L   Q   L   A   P   Y   G
469 AAC TAT TAT CAA AGT CTG GGA GCT GAC GAG TCA CTG AGA
157 N   Y   Y   Q   S   L   G   A   D   E   S   L   R
508 CGA ACA TAC GAA CTG CTG GCC TGT TTC AAG AAA GAC ATG
170 R   T   Y   E   L   L   A   C   F   K   K   D   M
547 CAC AAG GTG GAG ACC TAC CTG ACG GTG GCT AAA TGT CGA
183 H   K   V   E   T   Y   L   T   V   A   K   C   R
586 CTC TCT CCA GAA GCC AAC TGC ACC TTG TAG
196 L   S   P   E   A   N   C   T   L   -
    
```

图 1 鳊 GH cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 GH cDNA sequence of *S. chuatsi* and amino acid sequence

大眼鳊生长激素基因序列仅在第 554bp 处存在一个碱基的差异, 同源性 99.8%。它包含 615 个核苷酸, 编码 204 个氨基酸, 其中包括 17 个氨基酸的信号肽和 187 个氨基酸的成熟肽; 分子量为 23kDa, 等电点为 7.07; 酸性氨基酸 22 个, 占 10.78%; 碱性氨基酸 26 个, 占 12.74%; 疏水氨基酸为 90 个, 占 44.12%; 极性氨基酸 66 个, 占 32.36%。

应用 MEGA3.1 软件, 对鳊、大眼鳊(*S. kneri*)、条纹石鱼旨(*Morone saxatilis*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)、大西洋鲷(*Sparus aurata*)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*, GenBank 收录号 X65716)、斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Salmo gairdner*)、家鼠(*Mus musculus*)、猪(*Sus scrofa*)、人(*Homo sapiens*)等共 13 种脊椎动物生长激素 cDNA 编码区序列, 构建 UPMAM 系统发育树, 并进行 1000 次自展分析, 评价树的拓扑结构稳定性,

结果见图 2 (鲁双庆等, 2008; 刘滨等, 2008; 杨学明等, 2008; Zhang *et al*, 2005; Buggiotti *et al*, 2006; Wallis *et al*, 2006)。

2.2 鳊重组 GH 融合表达质粒的构建

用限制性内切酶 *EcoR* 和 *HindIII* 对 PCR 产物

表 1 鳊生长激素 cDNA 编码氨基酸组成
Tab.1 Amino acid composition of *S. chuatsi* GH cDNA encoding

类型	比例	氨基酸种类	数量	所占比率(%)		
疏水氨基酸	44.12%	Leu	31	15.20		
		Ala	11	5.40		
		Ile	11	5.40		
		Val	11	5.40		
		Phe	8	3.90		
		Trp	1	0.50		
		Met	2	1.00		
		Pro	8	3.90		
		Gly	7	3.40		
		亲水氨基酸	32.36%	Gln	13	6.40
Asn	6			2.90		
Cys	4			2.00		
Ser	28			13.70		
Thr	8			3.90		
Tyr	7			3.40		
酸性氨基酸	10.78%			Glu	12	5.90
		Asp	10	4.90		
		碱性氨基酸	12.74%	Lys	9	4.40
				Arg	13	6.40
				His	4	2.00

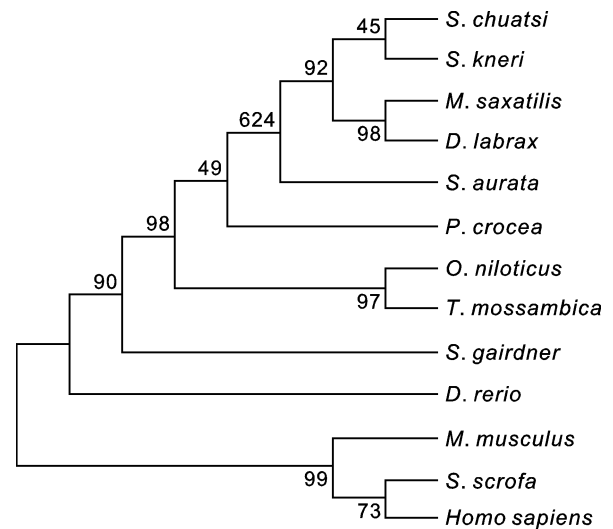


图 2 13 个物种 GH 系统发育树

Fig.2 Phynogenetic tree of 13 species in GH cDNA sequence

和原核表达载体 pET-32a(+)分别进行双酶切,回收酶切产物后按适当比例进行连接得到重组原核表达载体 pET-ScGH,将此重组载体转化大肠杆菌 BL21(DE3),快速抽提质粒后酶切及测序,表明鳊生长激素基因已正确插入到原核表达载体 pET-32a(+)中(图3)。

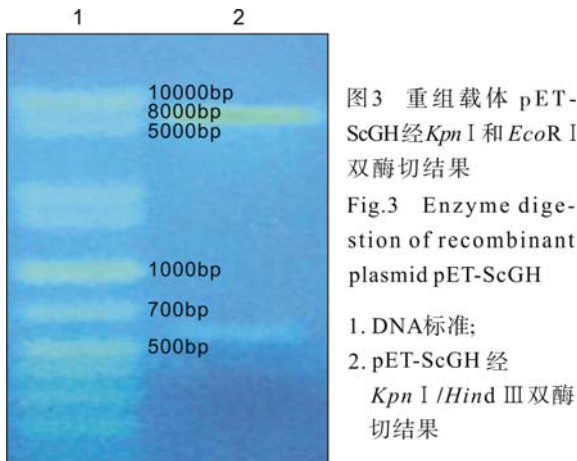


图3 重组载体 pET-ScGH经*Kpn* I 和*Eco*R I 双酶切结果
Fig.3 Enzyme digestion of recombinant plasmid pET-ScGH
1. DNA标准;
2. pET-ScGH 经 *Kpn* I /*Hind* III 双酶切结果

2.3 鳊重组 GH 在大肠杆菌中的表达产物检测

12% SDS-PAGE 电泳检测表达产物发现在 43kDa 处表达了生长激素基因与硫氧还蛋白(Thioredoxni, Trx)的融合蛋白,电泳结果用 BandScan 软件进行扫描分析,目的蛋白约占菌体总蛋白 58%(图4)。

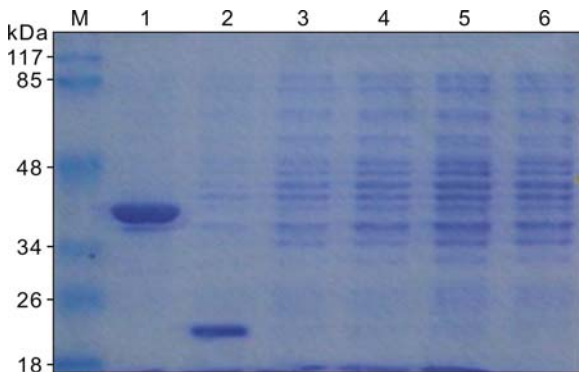


图4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression products
注: 1. pET-ScGH/BL21 诱导; 2. pET-32a(+)/BL21 诱导; 3. 空 BL21 诱导; 4. pET-ScGH/BL21 未诱导; 5. pET-32a(+)/BL21 未诱导; 6. 空 BL21 未诱导。M. 蛋白质标准

2.4 大肠杆菌中鳊重组 GH 蛋白表达的诱导条件

将不同诱导 IPTG 浓度、培养温度和时间下诱导表达的重组菌进行 SDS-PAGE,对比结果发现 IPTG

浓度对其表达影响不大, IPTG 浓度为 1.0mmol/L 蛋白表达量较高;诱导时间 4h, 蛋白表达达到饱和;培养温度为 27、32、37 和 42 时均有蛋白表达,但培养温度为 37, 蛋白表达较高。因此, IPTG 终浓度 1.0mmol/L、37 培养 4h 为本研究的蛋白表达的最佳诱导条件。

2.5 Western 印迹分析

将空载体质粒 pET-32a(+)和重组质粒 pET-ScGH 诱导表达后产物进行 SDS-PAGE,并转移到 PVDF 膜上,进行免疫印迹分析。结果显示,空载体 pET-32a(+)所表达的蛋白以及重组鳊 GH 融合蛋白均能与抗 6-His 单克隆抗体特异性结合,在 PVDF 膜上呈现出特异性的反应条带,分子量大小分别为 20kDa 和 43kDa 左右,大小与预期结果一致(图5)。融合蛋白含有的 6-His 有利于进一步的蛋白纯化。

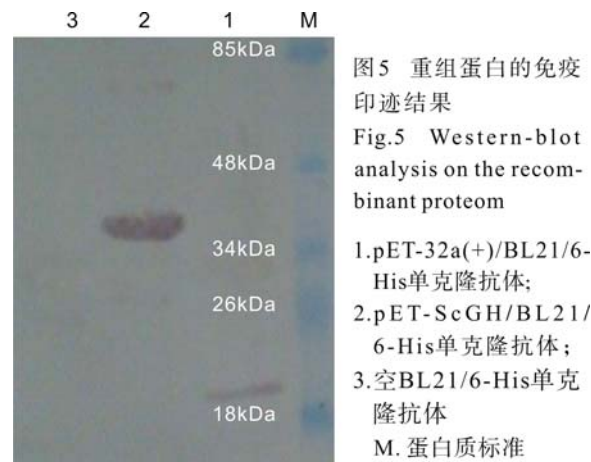


图5 重组蛋白的免疫印迹结果

Fig.5 Western-blot analysis on the recombinant proteom

1.pET-32a(+)/BL21/6-His单克隆抗体;
2.pET-ScGH/BL21/6-His单克隆抗体;
3.空BL21/6-His单克隆抗体
M. 蛋白质标准

3 讨论

经 DNAMAN 软件对 13 种脊椎动物生长激素 cDNA 编码区序列的同源性分析,本研究所克隆的鳊生长激素 cDNA 序列与同属的大眼鳊同源性达到 99.84%;与鲈形目的大西洋鲷、条纹石鲈、尼罗罗非鱼等的同源性都在 85%—90%以上,与鲑形目的虹鳟的同源性则为 64.14%;与鲤形目的斑马鱼的同源性为 59.31%。生长激素基因在鱼类之间的高度保守性,可使一种外源生长激素对多种鱼类起作用(王伟等,2000)。本研究的重组鳊生长激素有望作为饲料添加剂应用于水产养殖,以提高养殖鱼类的生长速度,缩短养殖周期,从而创造出更高的经济效益和社会效益,使我国鱼类养殖保持更快的持续发展。

本试验选用的原核表达载体 pET-32a(+)带有氨

芽抗性基因, 有利于筛选工程菌; 所带有的半乳糖苷(lac)操纵子, 在 IPTG 诱导控制下表达外源基因, 减少了在克隆过程中表达蛋白对宿主菌产生毒性; 此外 pET-32a(+)载体还带有硫氧还蛋白(Trx), 它能与外源蛋白融合在一起进行表达, 增加外源基因的可溶性; 在 pET-32a(+)载体多克隆位点的两端都带有 6-His 标签, 易于外源蛋白的纯化。

本研究成功构建了重组质粒 pET-ScGH, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中得到表达。经对诱导条件的优化, 当 IPTG 终浓度 1.0mmol/L、温度 37 和培养时间为 4h 时, 鳊生长激素基因(GH)在大肠杆菌中获得高效表达, 表达量约占菌体总蛋白 58%。但与巴斯德毕赤酵母表达系统相比, 大肠杆菌表达系统的作用明显不足。毕赤酵母具有表达产率高、遗传稳定、产物可高效分泌、发酵工艺成熟等优点。同时, 毕赤酵母的胞内表达蛋白的分选和区域化, 增加了表达蛋白的稳定性, 减少表达产物对宿主菌的毒害作用: 具有糖基化程度低等多种优点。下一步试验考虑用毕赤酵母表达鳊 GH, 以求取得更高更稳定的表达量, 提高经济效益。

参 考 文 献

- 丁 洁, 顾继锐, 伍翠芳等, 2006. 转生长激素基因中华倒刺鲤的构建及其检测. 淡水渔业, 36(3): 30—33
- 王 伟, 汪亚平, 孙永华等, 2000. 酵母表达的重组草鱼生长激素对鲤鱼的促生长效应. 高技术通讯, 12: 5—8
- 伍翠芳, 顾继锐, 刘会明等, 2004. 转生长激素基因彩鲫(*Colorful Curcain carp*)的获得及检测. 四川大学学报(自然科学版), 41(5): 1085—1087
- 刘 滨, 臧晓南, 刘顺梅等, 2008. 7 种鲈形目鱼类生长激素基因 cDNA 序列的克隆及系统分析. 武汉大学学报(理学版), 54(4): 485—491
- 刘顺梅, 臧晓南, 张学成等, 2007. 摄食转基因集胞藻牙鲢的安全性评价. 中国海洋大学学报(自然科学版), 37(3): 437—412
- 孙效文, 梁利群, 闫学春等, 2002. 转生长激素基因鲤的快速生长效应及传代. 水产学报, 26(5): 391—395
- 杨学明, 张 立, 黄光华等, 2008. 革胡子鲶生长激素基因克隆与序列同源分析. 西南农业学报, 21(2): 483—486
- 鲁双庆, 刘 峰, 刘 臻等, 2008. 三种鳊(*Siniperca*)生长激素基因的克隆及序列比较. 海洋与湖沼, 39(4): 354—361
- Beardmore J A, 1997. Transgenics: autotransgenics and al-lotransgenics. Transgenic Res, 6: 107—108
- Buggiotti L, Primmer C R, 2006. Molecular evolution of the avian growth hormone gene and comparison with its mammalian counterpart. Journal of Evolutionary Biology, 19(3): 842—854
- Cavari B, Funkenstein B, Chen T T, 1993. Effect of growth hormone on the growth rate of the gilthead seabream (*Sparusaurata*) and the use of different constructs for production of transgenic fish. Aquaculture, 111: 189—197
- Forsyth I A, Wallis M, 2002. Growth hormone and prolactin: molecular and functional evolution. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 7: 291—312
- Li Y H, Bai J J, Jian Q *et al*, 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 216: 329—341
- Liu Z, Moav B, Faras A J *et al*, 1990. Functional analysis of elements affecting expression of the α -actin gene of carp. Mol Cell Biol, 10: 3432—3440
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular cloning: a laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Harbor Laboratory Press, 265—267
- Tsai H J, Kuo J C, Lou S W *et al*, 1994. Growth enhancement of juvenile striped mullet by feeding recombinant yeast containing fish growth hormone. Progress of Fish Culture, 56: 7—12
- Wallis O C, Wallis M, 2006. Evolution of growth hormone in primates: the GH gene clusters of the New World monkeys marmoset (*Callithrix jacchus*) and white-fronted capuchin (*Cebus albifrons*). Journal of Molecular Evolution, 63(5): 591—601
- Zang X N, Liu B, Liu S M *et al*, 2007. Transformation and expression of *Paralichthys olivaceus* growth hormone cDNA in *Synechocystis* sp. PCC6803. Aquaculture, 266: 63—69
- Zhang Jing-Nan, Song Ping, Hu Jia-Rui *et al*, 2005. Molecular cloning and sequence analysis of full-length growth hormone cDNAs from six important economic fishes. Acta Genetica Sinica, 32(1): 19—29

CLONING AND PROKARYOTIC EXPRESSION OF GROWTH HORMONE GENE IN *SINIPERCA CHUATSI*

LIU Zhen¹, LUO Xiao-Hua^{1,2}, LU Shuang-Qing¹, XIE Di-Zhi^{1,2},
FANG Zhi-Jia¹, XIAO Ke-Yu²

(1. Department of Biotechnology & Environment Science, Changsha University, Changsha, 410003;

2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128)

Abstract GH cDNA was amplified and cloned from total RNA isolated from pituitary gland of *Siniperca chuatsi* by RT-PCR. Sequence analysis showed an open reading frame (ORF) of *S. chuatsi* growth hormone gene in size of 615bp, encoding 204aa of 23kDa and pI at 7.07, comprising 10.78% acidic, 12.74% basic, 44.12% hydrophobic, and 32.35% hydrophilic. The cDNA of mature growth hormone was directionally cloned in pET-32a(+), and then the recombinant expression vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3 plys). After induction by IPTG, an expected 43kDa fusion protein was found by SDS PAGE analysis, accounting for 58% of the total protein. Western blot demonstrated that the recombinant fusion protein can be recognized by anti-6 × His monoclonal antibody.

Key words *Siniperca chuatsi*, Growth hormone, Gene clone, Prokaryotic expression