

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)生长激素基因 cDNA 的克隆和原核表达*

郝羽^{1,2} 邓思平^{1,2} 刘丽^{1,2} 刘楚吾^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524025; 2. 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室
广东海洋大学 湛江 524025)

摘要 运用同源克隆方法,从军曹鱼脑垂体中分离了生长激素基因(GH)的全长 cDNA。结果表明,该基因 cDNA 全长 862bp,含 615bp 的开放阅读框(ORF),编码 204 个氨基酸;其中包括 22 个氨基酸的信号肽和 182 个氨基酸的成熟肽。采用 T-A 克隆构建 pMD18-T-CoGH 重组质粒,测序正确后经 *Nde* 和 *Xho* 双酶切获得 CoGH 片段,插入表达载体 pET-28a,获得 pET-CoGH 重组质粒并在表达宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)中用 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳显示在 22.4kDa 处有特异性的蛋白条带出现,Western-blotting 检测表明已经成功表达了融合蛋白,该蛋白主要以非可溶性的包涵体形式存在于菌体沉淀中。

关键词 军曹鱼,生长激素基因,cDNA 克隆,原核表达

中图分类号 Q789

鱼类生长激素(fish growth hormone, fGH)是由鱼类脑垂体前叶合成和分泌的一种蛋白多肽,分子量为 21—22kDa。对鱼类多个生理过程起作用:促进鱼体的生长(McLean *et al.*, 1997),参与鱼类蛋白质、脂肪和碳水化合物的新陈代谢(Donaldson *et al.*, 1979),调节鱼类渗透压(Barrett *et al.*, 1989),提高某些鱼类对盐水的适应力和提高鱼类对饵料的利用率,增强鱼类对环境的适应能力(Boeuf *et al.*, 1994; Reinecke *et al.*, 2005)。有研究证实,基因工程方法获得的生长激素具有代偿内源生长激素的功能(陈松林, 1993),肌肉注射外源生长激素可促进鱼体生长(Gill *et al.*, 1985);饵料中添加的生长激素可通过鱼体消化道后肠上皮细胞的胞饮作用吸收,提高鱼体的生长速度(简清等, 1999),而且在鱼体内半衰期短,不会造成累积(Moriyama *et al.*, 1993)。近年来,多数学者采用基因工程的方法获得生长激素,省去了提取天然生长激素的繁琐程序,使得大批量生产生长激素并将其

产业化成为可能(白俊杰等, 1999)。

军曹鱼(*Rachycentron canadum* Linnaeu)隶属鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidei)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(*Rachycentron*),俗称海鲷或海龙,分布于大西洋、印度洋和太平洋沿岸海域及港湾(孟庆闻, 1987)。军曹鱼为暖水性海洋鱼类,在我国主要分布于南海、东海,在黄海、渤海也有出现。军曹鱼肉质细嫩、鲜美,为大型食用鱼,生长速度快,经济价值高,是市场上畅销的水产品,现已成为我国南方沿海一带的重要海水网箱养殖对象。目前对于军曹鱼生长激素的人工表达,国内外尚未见文献报道。本研究运用 RT-PCR 方法对南海海域网箱养殖的军曹鱼生长激素(GH)基因进行克隆,并通过构建原核表达载体,生产外源生长激素。这可为生产大肠杆菌工程菌,实现外源蛋白在大肠杆菌中的高效表达提供前期基础。同时也可为实现转基因鱼育种以及生长激素制剂的开发奠定基础。

* 国家“十一五”科技支撑计划项目,2007BAD29B03号;国家自然科学基金项目,30972253号;广东省自然科学基金项目,8452408801001272号。郝羽, E-mail: haoyu3016@126.com

通讯作者: 刘楚吾, 教授, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

收稿日期: 2010-07-02, 收修改稿日期: 2010-09-23

1 材料与amp;方法

1.1 脑垂体的制备

健康军曹鱼(*Rachycentron canadum*)成鱼购自湛江水产品批发市场(体重 3.7kg, 体长 60cm), 取其脑垂体用于总 RNA 提取。

1.2 总 RNA 的提取、cDNA 的合成及引物设计

利用 Trizol 试剂(Invitrogen)一步法提取脑垂体总 RNA, 以总 RNA 为模板, 利用 M-MLV 反转录酶(Promega)合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中鲈形目鱼类生长激素基因编码区序列, 利用 DNAMAN6.0 软件设计并合成兼并性引物 P1: 5'-CCSATNGACAA RCAYG AGAC-3'; P2: 5'-CCTTGTGCATGTCYTTYT TGA-3', 用合成的脑垂体 cDNA 为模板扩增 GH 基因部分片段, 用引物 P1 和 Oligo(dT)₁₅ 扩增 cDNA 获得 3'端序列。RT 扩增条件为: 94℃变性 30s, 52℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 总计 30 个循环, 最后 72℃充分延伸 10min。扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测后送上海生工测序。设计特异引物 P3: 5'-ACCTGAACCTGAACC TGAAC-3'; P4: 5'-TCCCAAGACTCCACCAAT-3'用于扩增 3'端 cDNA 序列。PCR 反应条件为: 94℃变性 30s, 58℃复性 30s, 72℃延伸 60s, 35 个循环, 72℃延伸 10min。PCR 产物检测后送上海生工测序。根据上述测序结果, 利用 DNAMAN 软件对测序得到的序列片段进行拼接, 得到军曹鱼 cDNA 全序列。

1.3 原核表达载体的构建

根据军曹鱼 cDNA 成熟肽序列, 设计特异引物 P5: 5'-GCTGCATATGATGGACAGAGTTGTCGTCC-3'; P6: 5'-CACTCTCGAGTTACAGGGTGCAGTTAGC-3'。其中上下游引物分别带有 *Nde* 和 *Xho* 酶切位点。将扩增的含酶切位点的 GH 成熟肽用 *Nde*、*Xho* (Takara)连接到相同酶切后的原核表达载体 pET-28a 上(Merck-Novogen), 获得重组质粒 pET-CoGH, 将该重组质粒送上海生工测序。

1.4 重组 GH 在大肠杆菌中的诱导表达

将测序正确的重组质粒 pET-CoGH 转化到宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 涂布 LB 平板(含 50μg/ml 卡那霉素), 37℃培养过夜。挑单菌落培养 6h 鉴定阳性克隆。以 1:100 的比例接种于 LB 培养基中 37℃培养过夜, 次日以 1:50 的比例再接种到 50ml 新鲜 LB 培养基中, 37℃培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4—0.6, 加入 1mmol/L IPTG 进行诱导。

1.5 表达条件的优化

采用 25℃、30℃、37℃条件进行诱导确定适合

的诱导温度, 同时采用 0.1、0.4、0.7、1.0mmol/L IPTG 的浓度进行诱导, 在所设范围内确定最佳诱导温度和最佳诱导剂浓度后在培养过程中每隔 1h 取出 1ml 菌液进行 SDS-PAGE 确定最佳诱导时间。

1.6 目的蛋白的免疫印记分析

将诱导前后的含空载体和表达菌总蛋白电泳后, 用 Bio-Rad 公司的半干转印槽将目的条带转移到 PVDF 膜上, 用带 His-tag 的一抗与之反应, 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(anti-His antibody)和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(TIANGEN 产品), 各步骤之间用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 最后用 DAB 显色至有清晰的目标蛋白带出现, 用无菌水终止反应, 在成像系统中拍照。

2 结果

2.1 生长激素基因的克隆和序列分析

通过 RT-PCR 方法分别扩增出军曹鱼 GH cDNA 5'端和 3'端的部分基因片段, 长度分别为 358bp(图 1A)和 508bp(图 1B)。根据 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接, 得到了军曹鱼 GH 基因 cDNA 的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列(图 2)。该基因 cDNA 全长 862bp, 其中开放阅读框长 615bp, 编码 204 个氨基酸, 包括 22 个氨基酸的信号肽和 182 个氨基酸的成熟肽。利用 DNAMAN 软件, 将该序列推导的氨基酸序列与其他物种进行同源性比较发现: 军曹鱼 GH 基因与人、鼠、牛、猪和鸡的同源性分别为 28.8%、31.5%、33.9%、31.9%、36.7%; 与鲈形目的 8 种鱼类(尖吻鲈、青石斑鱼、麒麟、平鲷、黄鳍鲷、尼罗罗非鱼、美国

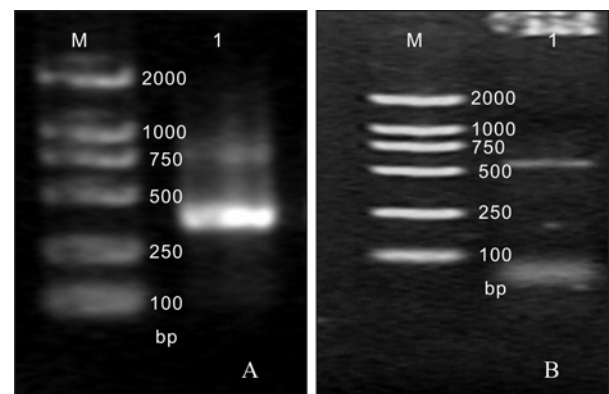


图 1 军曹鱼 GH 基因 cDNA 5'端(A)和 3'端(B)琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of 5' (A) and 3' (B) cDNA fragment of cobia GH in agarose gel

```

1  ATGGACAGAGTTGTCGTCCTGCTCTCAGTCTGTCTCTGGGGCTCTCCTCTCAGGCAATC
1  M D R V V V L L S V L S L G V S S Q A I
61  ACAGAAAAGCCAGCACCTTTTCTCCATTGCTGCTCAGCAGAGTTCAAAACCTCCACCTGCTT
21  T E S Q H L F S I A V S R V Q N L H L L
121 GCTCAGAGGCTCTTCTCCAACCTCGAGAGTACCTTACAGACTGAGGAGCAGCGTCAACTC
41  A Q R L F S N F E S T L Q T E E Q R Q L
181 AACAAAATCTTCTCTCAGGATTCTGTAACTCTGATTACATCATTAGCCCCATTGACAAA
61  N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K
241 CACGAGACACAGCGCAGCTCAGTTCTGAAGCTGTTATCAATCTCCTATCGATTGGTGGAG
81  H E T Q R S S V L K L L S I S Y R L V E
301 TCTTGGGAGTTCTCCAGTCGTTCTGTCTGAGGAGTTCTGCTCTCAGAAACAGATTTC
101 S W E F S S R S L S G G S A L R N Q I S
361 CCCAGACTGTCTGAAGTGAAGACAGGAATCCAAATGCTGATCAGGCCAATCAGGACAGA
121 P R L S E L K T G I Q M L I T A N Q D R
421 GCCGAGATGTTCCAGAAAGGCTCGGCACTCCAGCTGGCTCTTACGAAAACCTTCTATCAG
141 A E M F P E G S A L Q L A P Y G N F Y Q
481 AGCCTCGGAGACGATGAGTTGCTGAGACGAAACTATGAATTGCTGGCTGCTTCAAGAAG
161 S L G D D E L L R R N Y E L L A C F K K
541 GACATGCACAAGGTGGAGAGCTACCTGACAGTGGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCT
181 D M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A
601 AACTGCACCCTGTAG
201 N C T L *

```

图2 军曹鱼 GH 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
Fig.2 cDNA and translated amino acid sequences of cobia GH

红鱼、黄尾鲷鱼)同源性均达到 80%以上, 其中与鳟鱼的同源性最高, 达到 97.5%。

2.2 原核表达质粒的构建

将测序正确的军曹鱼 GH cDNA 片段双酶切后与经同样酶切过的表达载体 pET-28a 连接, 构建的重组

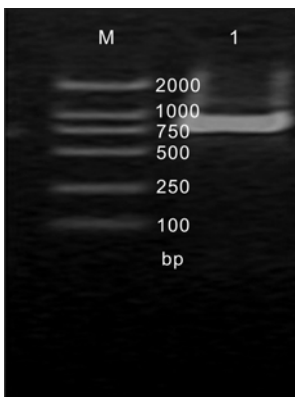


图3 军曹鱼 GH 重组表达质粒 pET-CoGH 菌液 PCR 鉴定
Fig.3 Identification of the recombinant plasmid pET-CoGH by PCR amplification

质粒命名为 pET-CoGH。菌液 PCR 鉴定阳性克隆(所用引物为通用引物 T7, T7Ter)及测序表明 GH 已正确插入到 pET-28a 上(图 3)。

2.3 大肠杆菌的诱导表达及条件优化

将 pET-CoGH 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 采用 25℃、30℃、37℃ 诱导表达结果表明, GH 融合蛋白在 37℃ 表达最强, 30℃ 次之, 而

25℃ 条件下表达量最少(图 4A)。采用 0.1、0.4、0.7、1.0mmol/L IPTG 诱导 GH 融合蛋白的表达结果表明, IPTG 的浓度为 1mmol/L 时, 蛋白表达量达到最大(图 4B)。在诱导温度为 37℃, IPTG 的浓度为 1mmol/L 时, 诱导 4h 后, GH 融合蛋白表达量达到最高(图 5A)。

2.4 目的蛋白的免疫印记分析

Western-blotting 检测结果(图 5B)表明, 融合蛋白可以特异性地与 anti-His 抗体识别, 在重组蛋白大小

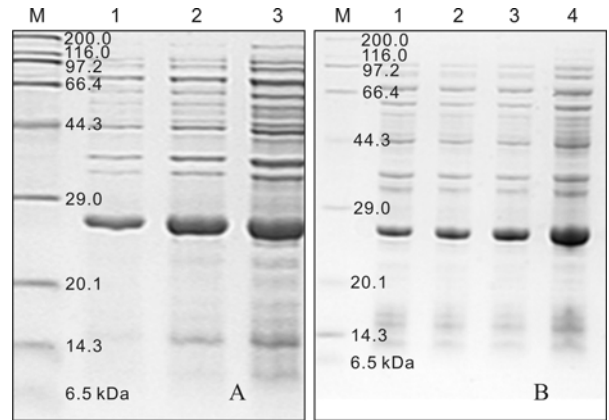


图4 不同温度(A)、IPTG 浓度(B)下军曹鱼 GH 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression of pET-CoGH at different temperature (A) and concentration of IPTG
A: 1、2、3 泳道分别为 25℃、30℃、37℃ 诱导的全菌蛋白。
B: 1、2、3、4 泳道分别为诱导温度为 37℃, 诱导时间为 4h 时, 0.1、0.4、0.7、1.0mmol/L IPTG 诱导的全蛋白。
M 为蛋白分子量标准

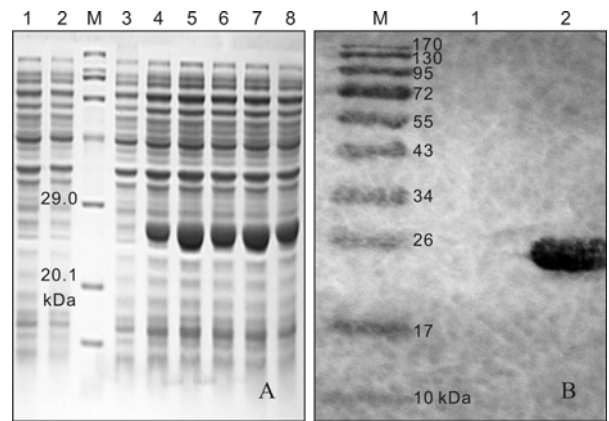


图5 不同时间诱导军曹鱼 GH 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析(A)以及重组蛋白的 Western-blotting 结果检测(B)

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression of pET-CoGH at different induction time (A) and Western-blotting analysis of recombinant pET-CoGH proteins (B)
A: 1. pET-28a 未诱导; 2. pET-28a 37℃ 诱导 4h; 3—8. 诱导温度为 37℃, 1mmol/L IPTG 分别诱导 pET-CoGH 0—5h。B: 1. 阴性对照; 2. pET-CoGH 蛋白印记。M: 蛋白分子量标准

处出现了很强的免疫条带,而未用 IPTG 诱导的重组子蛋白则不能与 anti-His 单抗发生反应,充分表明融合蛋白在大肠杆菌中成功表达。

3 讨论

随着生长激素分离技术的不断发展,目前已阐明多种鱼类的生长激素结构(Yowe *et al.*, 1995; 鲁双庆等, 2008; 于辉等, 2008; 刘臻等, 2010), 并证明无论是在分子量还是氨基酸组成上, 鱼类生长激素与其他高等脊椎动物生长激素有较高的同源性(孙逊等, 1999)。本研究得到的军曹鱼生长激素基因 cDNA 全长 862bp, 其中开放阅读框长 615bp, 编码 204 个氨基酸。由核苷酸序列推导的氨基酸序列含有 4 个半胱氨酸残基, 分子量为 22.4kDa, 等电点为 7.46。DNAMAN 软件分析其氨基酸序列与鲈形目鱼的相似度达到 90%以上, 与哺乳类、两栖类、鸟类的相似度低于 40%, 而同一个目中的鱼类相似度却超过 80%, 这充分说明 GH 基因在亲缘关系近的物种间具有高度的保守性。

有关重组鱼类 GH 表达的报道较多, 无论是选用大肠杆菌(白俊杰等, 1999)、酵母(王伟等, 2003)还是藻类(Kawata *et al.*, 1991)、昆虫细胞(Tsai *et al.*, 1994)、拟南芥(肖生科等, 2004)作为表达的宿主均有成功的实例。但是由于大肠杆菌表达系统的遗传背景清楚、繁殖速度快、表达量高、成本低, 同时它也是目前研究最成熟的表达体系, 绝大多数研究者选用大肠杆菌作为重组蛋白表达的宿主菌(谢磊等, 2004)。本研究选择了大肠杆菌 BL21(DE3)作为宿主菌, 选用表达载体 pET-28a, 以 T7 RNA 聚合酶启动转录, 能专一性识别 T7 强启动子, 且具有比大肠杆菌 RNA 聚合酶高数倍的转录效率。N 末端含有 His-Tag, 便于后期的分离和纯化。在构建表达载体时, 没有去掉信号肽序列, 目的就是尽可能增加可溶蛋白在总蛋白中的含量。外源蛋白在宿主中的表达会受到诱导条件的影响。为了使蛋白能够更好的表达, 本实验优化了表达条件。影响蛋白表达量的因素除了与表达载体、宿主菌和外源基因有关外, 还受到表达时诱导条件的影响。诱导条件主要涉及温度, IPTG 的浓度, 还有诱导表达的时间。试验中根据表达载体本身的特点设计了三个温度条件, 分别为 25℃、30℃和 37℃。发现在 37℃时蛋白的表达量最大, 但是主要以包涵体的形式存在。而 25℃时, 产生了少量可溶蛋白, 分析可能是因为低温时蛋白产生速度缓慢, 有充足的时间形成正确的结构, 而高温时则来不及形成正确结构, 只

能以包涵体的形式存在。IPTG 是一种作用极强的诱导剂, 不被细菌代谢而且十分稳定, 因此被实验室广泛应用于蛋白表达。通过实验发现 IPTG 的浓度在 1.0mmol/L 时蛋白的表达量最大, 而在低浓度时相对表达量较小, 可能是低浓度的 IPTG 对蛋白的诱导不够充分。随着诱导时间的增加, 蛋白表达量逐渐增加, 但是到达一定程度时反而影响了蛋白量的增加, 可能是由于到达 4h 时, 细菌生长处于饱和状态, 随着时间的增加, 细菌之间处于竞争状态, 必然会导致蛋白量的降低。但是衡量蛋白的优劣不在于表达的量是否最大, 还与所表达的蛋白是否可溶有关。本实验得到的蛋白大部分是以包涵体的形式存在, 形成包涵体有利于蛋白的纯化, 这是因为包涵体可以保护蛋白免受蛋白酶水解, 另外毒性蛋白以无活性的包涵体形式表达, 不会影响宿主菌的生长。但是如果要进行后续的研究就要采用化学方法或降低诱导温度增加可溶蛋白。

参 考 文 献

- 于 辉, 李 华, 颜其贵等, 2008. 五种鲤科鱼类生长激素 cDNA 的克隆和序列分析. 广东海洋大学学报, 28(4): 1—5
- 王 伟, 孙永华, 2003. 草鱼生长激素在毕赤酵母中的高效分泌表达. 遗传学报, 30(4): 301—306
- 白俊杰, 马 进, 1999. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)生长激素基因克隆及原核表达. 中国生物化学与分子生物学报, 15(3): 409—412
- 刘 臻, 罗小华, 鲁双庆等, 2010. 鳊(*Siniperca chuatsi*)生长激素基因克隆和原核表达. 海洋与湖沼, 41(3): 365—370
- 孙 逊, 朱尚权, 1999. 生长激素的结构与功能. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 19(1): 6—9
- 肖生科, 王 磊, 胡治球等, 2004. 石斑鱼生长激素基因的合成及其在拟南芥中的表达. 西北农林科技大学学报, 32(9): 57—60
- 陈松林, 1993. 鱼类多肽激素基因工程研究进展及展望. 水产学报, 17(3): 264—271
- 孟庆闻, 1987. 鱼类学. 上海: 上海科学技术出版社, 261—263
- 鲁双庆, 刘 峰, 刘 臻等, 2008. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因的克隆及序列比较. 海洋与湖沼, 39(4): 354—361
- 谢 磊, 孙建波, 张世清等, 2004. 大肠杆菌表达系统及其研究进展. 华南热带农业大学学报, 10(2): 16—20
- 简 清, 白俊杰, 1999. 饲料中添加重组鱼生长激素对罗非鱼鱼种的促生长作用研究. 淡水渔业, 29(3): 3—5
- Barrett B A, McKeown B A, 1989. Plasma growth hormone levels in *Salmo gairdneri*: studies on temperature and the exercise intensity/duration relationship. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 94(4): 791—794
- Boeuf G, Marc A M, Prunet P *et al.*, 1994. Stimulation of parr-smolt transformation by hormonal treatment in Atlantic

- salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 121(1—3): 195—208
- Donaldson E M, Fagerlund U H M, Higgs D A *et al*, 1979. Hormonal enhancement of growth. *Fish Physiology*, 8: 455—597
- Gill J A, Sumpter J P, Donaldson E M *et al*, 1985. Recombinant chicken and bovine growth hormones accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Nature Biotechnology*, 3(7): 643—646
- Kawata Y, Yamano N, Kojima H *et al*, 1991. Expression of salmon growth hormone in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Biotechnology Letters*, 13(12): 851—856
- McLean E, Devlin R H, Byatt J C *et al*, 1997. Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growth and seawater adaptation in coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. *Aquaculture*, 156(1—2): 113—128
- Moriyama S, Yamamoto H, Sugimoto S *et al*, 1993. Oral administration of recombinant salmon growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 112(1): 99—106
- Reinecke M, Björnsson B T, Dickhoff W W *et al*, 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and comparative endocrinology*, 142(1—2): 20—24
- Tsai H J, Chen H M, Lo C F, 1994. Secretory synthesis of active recombinant fish growth hormone by insect cells using a baculovirus vector. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(1): 1—7
- Yowe D L, Epping R J, 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene*, 162(2): 255—259

CLONING OF cDNA FOR *RACHYCENTRON CANADUM* GROWTH HORMONE AND ITS EXPRESSION IN PROKARYOCYTE

HAO Yu^{1,2}, DENG Si-Ping^{1,2}, LIU Li^{1,2}, LIU Chu-Wu^{1,2}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025; 2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025)

Abstract The full length cDNA encoding growth hormone of *Rachycentron canadum* was amplified and cloned from total RNA isolated from pituitary gland by RT-PCR. The sequence was 862 nucleotides long, including an ORF of 615 base pairs. The encoded protein contains 204 amino acids, comprising a 22 amino acids signal peptide and a 182 amino acids mature protein. The resulting cDNA sequence was undergone sequence analysis and subcloned into expression vector pET-28a between *Nde* and *Xho* restriction sites and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. SDS-PAGE and Western-blotting analysis showed that the expressed protein accumulated as inclusion bodies and the molecular weight of expressed fusion protein was 22.4kDa.

Key words *Rachycentron canadum*, Growth hormone gene, cDNA cloning, Prokaryotic expression