

## 星突江鲈生长激素基因的克隆及体外重组表达分析

臧 坤<sup>1,2</sup>, 柳学周<sup>1\*</sup>, 徐永江<sup>1</sup>, 张 凯<sup>3</sup>,  
史 宝<sup>1</sup>, 史学营<sup>1,2</sup>, 李存玉<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 青岛贝宝海洋科技有限公司,山东 青岛 266000)

**摘要:** 利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)获得星突江鲈生长激素基因(GH)的 cDNA 序列全长为 957 bp,其中开放阅读框(ORF)长 615 bp,编码 204 个氨基酸,氨基酸序列与牙鲆同源性最高达到 73.0%,系统进化显示,星突江鲈 GH 与其他鲈形目和鲈形目鱼类聚为一个分支。采用实时荧光定量 PCR 技术对 GH 基因的组织表达特性进行了分析,结果显示,GH 基因 mRNA 主要在雌雄成鱼垂体中表达,同时在脑、性腺、肝脏、胃和肌肉中均检测到表达,雌鱼胃和肌肉中 GH 基因 mRNA 的表达量显著高于雄鱼( $P < 0.05$ ),表明星突江鲈 GH 可能主要通过旁分泌和自分泌方式参与性别二态性生长调节。本实验成功构建了体外重组表达质粒 GH/pET28a,转化大肠杆菌 BL21(DE3)经 IPTG 诱导可得 N 端含 6 个组氨酸的重组蛋白。重组蛋白主要以大小为 24.9 ku 的包涵体形式存在,Western-blotting 免疫印迹呈阳性。包涵体经 6 mol/L 盐酸胍变性、 $\text{Ni}^{2+}$  离子亲和柱纯化和尿素梯度复性后可得纯化 GH 蛋白;5.4 和 16.2  $\mu\text{g/mL}$  重组蛋白添加组中,人胚胎肾细胞 HEK293T 的增殖受到显著抑制。本研究结果可在分子和蛋白水平解析星突江鲈的生长调控机制。

**关键词:** 星突江鲈;生长激素;基因克隆;组织表达;原核表达

**中图分类号:** Q 785; S 965.3

**文献标志码:** A

鱼类生长激素(GH)是由垂体前叶细胞合成和分泌的一种单链多肽激素,对鱼类生长发育调节具有重要意义<sup>[1]</sup>。已有研究表明,GH 具有增强食欲、提高饵料转化率、提高生长速度等作用<sup>[2]</sup>,进一步研究证实,GH 主要通过促进鱼类物质代谢<sup>[1]</sup>和细胞代谢水平<sup>[3]</sup>,以及促进细胞增殖与分化<sup>[4]</sup>而发挥作用。同时,GH 在鱼类渗透压调节<sup>[5]</sup>、生殖<sup>[6]</sup>、早期发育<sup>[7]</sup>、行为调节<sup>[8]</sup>以及免疫力调节<sup>[9]</sup>等方面也有重要的调控作用。GH 主要通过两种方式发挥作用,一是直接激活靶细胞膜上的受体,二是促进肝脏和其他组织产生胰岛素样生长因子(IGFs)间接发挥作用。GH 能以完整大分子蛋白的形式通过胞饮作用进入血液而不影响生物学活性,从而实现对鱼体生

长的促进作用<sup>[10]</sup>,获得的鱼类 GH 应用于水产养殖业可提高经济效益,但直接从鱼类脑垂体中提取 GH 很困难<sup>[11]</sup>,体外重组表达则解决了这一问题。Sekine 等<sup>[12]</sup>于 1985 年首次实现大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*) GH 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的诱导表达,目前已有斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、肺鱼(*Protopterus annectens*)、鲶(*Silurus asotus*)、淇河鲫(*Carassius auratus gibelio* var.)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)等几十种鱼类的 GH 基因相继在大肠杆菌中得到了表达并获得体外重组的 GH 蛋白<sup>[13]</sup>。鲈(*Lateolabrax japonicus*)<sup>[14]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[15]</sup>和鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[16]</sup>等 GH 基因则进

收稿日期:2014-06-16 修回日期:2014-07-08

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A413);鲈鲈类现代产业技术体系专项(CARS-50);山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ025)

通信作者:柳学周,E-mail:liuxz@ysfri.ac.cn

一步在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中实现了表达,并通过投喂实验证明了重组 GH 蛋白的生物活性。随着 GH 生物功能的不断挖掘,体外重组蛋白表达及纯化技术的不断进步,GH 及其产物制剂在水产养殖中的应用研究正不断加快。

星突江鲮(*Platichthys stellatus*),属鲮形目(Pleuronectiformes)、鲮科(Pleuronectidae)、江鲮属(*Platichthys*),分布于中国、日本、俄罗斯、加拿大及美国太平洋沿岸,是一种具有较高经济价值的鲆鲽类鱼种,具有营养丰富、经济价值高、广温广盐、耐受性强等特点,在东亚地区深受消费者喜爱<sup>[17]</sup>。近年来,中国突破了星突江鲮的人工繁育技术<sup>[18]</sup>,养殖产业正在逐步形成。为了探究其生长特性,建立实用的养殖生长调控技术,认识其生长调控的分子机制,本实验采用 RACE 技术获得了星突江鲮 GH 的 cDNA 全长序列,利用实时荧光定量 PCR 技术检测了其 mRNA 组织表达特性,并使用原核表达载体构建了星突江鲮 GH 成熟肽重组质粒,实现了 GH 重组蛋白的体外高效表达,同时,分析了重组星突江鲮 GH 蛋白生物活性,以期为进一步解析 GH 在星突江鲮生长发育中的调控机制提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用星突江鲮取自青岛忠海水产有限公司,取样 3 尾雌鱼[(905.4 ± 32.5)g,3 龄]和 3 尾

雄鱼[(687.8 ± 41.7)g,3 龄]用 MS222(260 mg/L)快速麻醉致死,快速获取脑、鳃、性腺、心脏、肠、头肾、肾脏、肝脏、肌肉、垂体、幽门垂和胃等组织,迅速投入液氮中后转入 -80 °C 保存待用。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

用 RNAiso Plus(TaKaRa)抽提雌雄成鱼组织总 RNA,以微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)测定浓度,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。使用雌鱼垂体总 RNA,以 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第一链,用于 GH 基因 RACE 全长克隆;分别取 3 尾雌鱼和 3 尾雄鱼各组织的总 RNA,用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA 第一链,用于 GH 基因 mRNA 组织表达特性分析。所有操作步骤按照试剂盒说明书进行。

### 1.3 GH 基因 cDNA 克隆

设计简并引物 GHF 和 GHR(表 1),以垂体 3'-RACE cDNA 作为模板,扩增星突江鲮 GH 基因的核心序列,PCR 反应体系 25 μL,反应条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,61 °C 30 s,72 °C 50 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T1 载体(Transgen)连接,转化至 Trans1-T1 感受态细胞(Transgen),LB 固体培养基 37 °C 培养过夜,挑取阳性克隆送至北京华大基因公司测序。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Nucleotide sequences of primers used for PCR amplification

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	用途 usage
GHF	CAGCCGGTTATAGACCAGCG	保守片段克隆
GHR	CTACAGGGTACAGTTAGCTTCTGG	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE PCR
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'和 3'-RACE PCR
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE 巢式 PCR
GH 5' OUTER	CTCAGAGAATCCACTCGCTCCGTCCT	5'-RACE PCR
GH 5' INNER	AACCAGGTGAAGATACTGAACTCG	5'-RACE 巢式 PCR
GH 3' OUTER	TTTCGCTGTGAGGACCCAGGTTACG	3'-RACE PCR
GH 3' INNER	GGATATGCACAAGGTGGAGACG	3'-RACE 巢式 PCR
GH-RTF	AGCTAACTGCACCCTGTAGCC	GH real-time PCR
GH-RTR	TTGGAATGCACAACCAACAT	
<i>β-actin</i> RTF	AGAGGTTCCGTTGTCCAGAG	<i>β-actin</i> real-time PCR
<i>β-actin</i> RTR	TGATGCTGTTGTAGGTGGTCTC	

根据扩增得到的核心序列设计 RACE 引物 GH 5' OUTER、GH 5' INNER、GH 3' OUTER 和 GH 3' INNER(表 2),用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech)进行 PCR 扩增。第一次梯度 PCR 使用引物 GH 5' OUTER 和 GH 3' OUTER,PCR 条件:94 °C 30 s;71 °C 30 s,16 个循环, $T_m$  每个循环降低 0.5 °C,72 °C 延伸 1 min;然后 94 °C 30 s,63 °C 30 s,72 °C 60 s,28 个循环。

以第一次 PCR 产物为模板,使用引物 GH 5' INNER 和 GH 3' INNER 进行巢式 PCR,PCR 条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,58 °C 50 s,72 °C 50 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的条带进行回收、与载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

表 2 星突江鲮 GH 基因氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较  
Tab.2 Identity of the precursor peptide sequences for GH gene between *P. stellatus* and other vertebrates.

物种 species	GenBank 序列号 accession no.	同源性/% identity
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	BAA06159	73.0
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	AAX38234	58.8
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	ACM43287	51.0
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	ADB23477	69.6
眼斑拟石首鱼 <i>Sciaenops ocellatus</i>	AAF61751	67.6
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	AAA49626	63.7
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	Q9I9M4	64.2
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	AAK57697	70.1
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	AAB19750	69.1
大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha-1</i>	ACD37715	55.4
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss-1</i>	NP_001118161	54.9
大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha-2</i>	CD37716	49.5
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss-2</i>	NP_001118162	53.4
胡子鲶 <i>Clarias batrachus</i>	AAL84164	31.4
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	CAI79040	32.4
亚口鱼 <i>Catostomus catostomus-2</i>	ADD84539	34.8
蓝头亚口鱼 <i>Catostomus discobolus-2</i>	ADD84545	31.9
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	ABV64406	36.3
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	AAQ19263	31.9
亚口鱼 <i>Catostomus catostomus-1</i>	ADD84537	21.2
蓝头亚口鱼 <i>Catostomus discobolus-2</i>	ADD84543	24.5
欧洲鳗鲡 <i>Anguilla Anguilla</i>	AAN61122	24.0
北美牛蛙 <i>Rana catesbeiana</i>	AAB24792	27.5
欧洲鳊 <i>Huso huso</i>	ADQ39312	24.5
鸡 <i>Gallus gallus</i>	AEZ51853	20.6
棕树蛇 <i>Boiga irregularis</i>	BAJ14513	19.6
鼠 <i>Mus musculus</i>	AAH61157	15.7
人 <i>Homo sapiens</i>	AAA98618	16.2

#### 1.4 实时荧光定量 PCR 检测

根据所得星突江鲮 GH 基因的 cDNA 序列全

长设计定量引物 GH-RTF 和 GH-RTR,以星突江鲮  $\beta$ -actin 为内参设计定量引物  $\beta$ -actin RTF 和  $\beta$ -

actin RTR, 利用 Mastercycler ep realplex real-timePCR 仪 (Eppendorf), 使用 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa), PCR 体系 20  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  的 cDNA 模板, 0.8  $\mu\text{L}$  的上、下游引物, 10  $\mu\text{L}$  的 SYBR Premix ExTaq™ II 和 7.4  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O, 采用两步法 PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  20 s 共 40 个循环。GH 基因 mRNA 的表达量以  $\beta$ -actin mRNA 为内参, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法<sup>[19]</sup> 计算 GH 基因 mRNA 在雌雄成鱼各组织的相对表达量。

### 1.5 序列分析

星突江鲮 GH 基因的序列拼接、氨基酸序列推导、分子量预测、等电点预测及氨基酸同源性分析均使用 DNASTAR 5.0.1, 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/download/current/>) 和 MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net/mega51.html>)。

### 1.6 GH/pET28a 重组质粒的构建

根据星突江鲮 GH 成熟肽序列, 参照 pET-28a 载体上的多克隆位点排列特点, 选取 BamH I 和 Hind III 作为酶切位点, 设计 1 对特异性引物 GHF: 5'-GGATCC CAGCCAATCACAGAGAACCAG-3' 和 GHR: 5'-AAGCTT TTACAGGGTGCAGTTAGCTTCTG-3'。在引物 GHF 和 GHR 的 5' 端分别加入了 BamH I 和 Hind III 酶切位点(方框标注), 在下游引物 GHR 中加入强终止密码子 TAA(下划线标注)。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 34 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 将成熟肽片段连接到 pEASY-T1 Simple 载体上, 利用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 将 GH/pEASY-T1 质粒和表达载体 pET-28a 双酶切, 使用 T<sub>4</sub> 连接酶连接得到重组质粒 GH/pET28a, 转化至大肠杆菌 BL21, 菌液 PCR 验证并测序。

### 1.7 重组 GH 蛋白表达和 Western-blotting 验证

将测序正确的表达菌株 BL21 接种于含 Kana (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 5 mL LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜。次日按 1:100 扩大培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.7, 加入 IPTG (1 mmol/L) 继续培养, 分别在诱导 0、1、2、3、4、6 和 8 h 时各取 1 mL 菌液, 8 000

r/min 10 min 离心收集菌体, PBS 洗涤并重悬菌体, SDS-PAGE (15% 分离胶) 电泳检测, SigmaScan pro 5 软件分析蛋白表达率。菌液分别在 21、29、37、45  $^{\circ}\text{C}$  条件下 IPTG (1 mmol/L) 诱导 6 h 取样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以研究不同温度下蛋白表达的差异。菌液在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.7 时, 加入 IPTG 使其终浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mmol/L, 诱导 6 h 取样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以研究不同 IPTG 浓度对重组载体蛋白表达的诱导作用。

收集诱导 6 h 的菌体沉淀经 SDS-PAGE 电泳后, 利用半干电转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上并用 5% BSA 封闭, 以鼠抗 6  $\times$  His Monoclonal Antibody 为一抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  下分别孵育过夜, 使用 HRP-DAB 显色试剂进行显色。

### 1.8 GH 重组蛋白的纯化和复性

37  $^{\circ}\text{C}$  条件下 IPTG (1 mmol/L) 诱导重组菌 6 h 后, 8 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, PBS 洗涤沉淀, 超声波破碎, 破碎后沉淀洗涤 2~3 次, 溶于裂解液 4  $^{\circ}\text{C}$  搅动过夜变性, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 先后用 0.8  $\mu\text{m}$  和 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 然后 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱 (TaKaRa) 分离纯化重组蛋白。分离后重组蛋白依次用 8、6、4.2 mol/L 尿素梯度复性液和 PBS 充分透析复性, 3 ku 超滤管 (Millipore) 超滤浓缩, -80  $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存。

### 1.9 GH 重组蛋白的生物活性检测

利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测纯化复性后的重组蛋白浓度, 0.22  $\mu\text{m}$  过滤除菌, 根据刘芝亮等<sup>[20]</sup> 方法检测重组 GH 蛋白在终浓度分别为 0.2、0.6、1.8、5.4、16.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对人胚胎肾细胞 HEK293T 的增殖作用。细胞增殖率 (GSR) 计算方法:  $\text{GSR} (\% \text{ control}) = A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100$ ,  $A_{\text{sample}}$  为加入重组蛋白组,  $A_{\text{control}}$  为未加重重组蛋白组。

### 1.10 数据处理

实验数据均以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 两组数据的比较使用 SPSS 16.0 进行  $T$  检验。多组数据间比较采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 多重比较分析,  $P < 0.05$  时表示差异显著,  $P < 0.01$  时表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 星突江鲮 *GH* 基因 cDNA 序列全长

星突江鲮 *GH* 基因的 cDNA 序列全长为 957 bp, 包括 131 bp 的 5' 非编码区 (UTR)、615 bp 的开放阅读框 (ORF) 和 211 bp 的 3' 非编码区 (UTR), 编码 204 个氨基酸。N 端第 1 至第 24 位氨基酸为推测的信号肽序列, 4 个保守的半胱氨酸分别位于第 69、177、194 和 202 位氨基酸。*GH* 成熟肽预测的分子量为 21.5 ku, 等电点为 7.83 (图 1)。该序列已提交至 GenBank 数据库 (获取

号 KC709504)。

### 2.2 星突江鲮 *GH* 基因的氨基酸序列比较

同源性分析显示, 星突江鲮 *GH* 基因的氨基酸序列与鲮形目、鲈形目的同源性达到 50.5% ~ 73.0%, 与牙鲆的同源性最高为 73%; 与鲑形目鱼类同源性为 49.5% ~ 53.4%; 与鲤形目鱼类同源性为 21.2% ~ 36.3%; 与鲇形目鱼类同源性为 31.4%; 与鲟形目鱼类同源性下降到 24.5%。此外与两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类和人的同源性分别为 27.5%、19.6%、20.6%、15.7% 和 16.2% (图 2)。

```

-131                               AC ATG GGG ACA CTG AAG AAC TGA-109
-108TCC TGA ACC TGA ACT GAA CCA GAT CCT GAA CCA GAT CCT GAA CCT GAA CCT GGA -55
-54 CAC GAA CCT GGA GCA GAA ACA GAA CCA GAA CTA AAA TCT GAA CTA GAA CCA GCC -1
  1 ATG AAC AGA GTC ATC CTC CTG CTG TCA GTC ATG TGT GTG GGC GTG TCC TCT CAG 54
  1 M N R V I L L L S V M C V G V S S Q 18
 55 CCA ATC ACA GAG AAC CAG CGT CTG TTC TCG ATC GCA GTT GGT CGA GTT CAG TAT 108
 19 P I T E N Q R L F S I A V G R V Q Y 36
109 CTT CAC CTG GTT GCT AAG AAA CTC TTC AGT GAC TTC GAG AAC TCT CTA CAG TTG 162
 37 L H L V A K K L F S D F E N S L Q L 54
163 GAG GAT CAA CGT CAA CTC AAC AAA ATC TTT TTA CAA GAT TTT TGT CAT TCT GAT 216
 55 E D Q R Q L N K I F L Q D F C H S D 72
217 TAT TTC TTG AGT CCG ATC GAC AAA CAT GAG ACA CAA CGC AGC TCA GTT TTG AAG 270
 73 Y F L S P I D K H E T Q R S S V L K 90
271 CTG TTA TCG ATC TCT TAT CGA TTG ATT GAG TCC TGG GAG TTC TCC AGT CGC TTC 324
 91 L L S I S Y R L I E S W E F S S R F 108
325 CTG GTC GCA GGT TTC GCT GTG AGG ACC CAG GTT ACG TCC AAA CTG TCG GAG CTG 378
109 L V A G F A V R T Q V T S K L S E L 126
379 AAG ACA GGA CTC ATG AAA CTG ATT GAG GCC AAT CAG GAC GGA GCG AGT GGA TTC 432
127 K T G L M K L I E A N Q D G A S G F 144
433 TCT GAG AGC TCG GTG ATC CAG CTC ACG CCG TAC GGA AAC TAC TAC CAG AGC GTC 486
145 S E S S V I Q L T P Y G N Y Y Q S V 162
487 GGA GTC GAT GAG TCA TTC AGA CGA AAC TAC GAA CTG TTC GCC TTC AAA AAG 540
163 G V D E S F R R N Y E L F A C F K K 180
541 GAT ATG CAC AAG GTG GAG ACG TAT CTG ACC GTG GCC AAA TGC CGA CTC TCT CCA 594
181 D M H K V E T Y L T V A K C R L S P 198
595 GAA GCT AAC TGC ACC CTG TAG 615
199 E A N C T L * 204
616 CCC CGC CTT TCC ACC ACG AAG CAC CTC CCC GCA GAT GAC ATC ATA GGC ATT CTG 669
670 TAG CCC CCC CCC ATG GTT GCC GAG CTA ACT AGC ATA AAT GTT AGC CTA TGT TGG 723
724 TTG TGC ATT CCA AAC AGA TGA TGT CAT TGT GAT ATT GTC ATA CTG TCA GCA AAI 777
778 AAA GGG TTC ATT CAA TCA ACC AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A 826

```

图 1 星突江鲮 *GH* 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

推导的氨基酸序列以单字母表示, 从阴影显示的起始甲硫氨酸开始计数。信号肽用单下划线表示, N-糖基化位点用点状线表示, 4 个保守的半胱氨酸残基用圆圈表示, AATAAA 加尾信号用双下划线表示, 终止密码子 (TAG) 用 \* 表示

Fig. 1 The full-length cDNA sequence of *GH* gene and the deduced amino acid sequence from *P. stellatus*

The deduced amino acid residues are represented as single letter abbreviations and numbered from the initiating methionine which is shadowed. The signal peptide is single underlined, the potential N-glycosylation site is shown by the dotted underline. Four Cys residues are circled, and the AATAAA sequence that indicates the polyadenylation signal is double underlined. The stop codon is marked by an asterisk

<i>Platichthys stellatus</i>	1	LPSPDFENSLQLEDQRQLNKIFLQDF	CHSDYFLSPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLIESWE
<i>Paralichthys olivaceus</i>	1	.....L.....ASKE.....	.....N.....G.....Q.....V.....
<i>Scophthalmus maximus</i>	1	.L.E.SP.T.....V...V.VY	N...II...NN.....Y...V...
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	1	Y.....T.....F...H...	NP.NIII.DN.....N.L.K.VD...
<i>Dicentrarchus labrax</i>	1	...E...S...T.E.....	.....N...II.....
<i>Odontesthes bonariensis</i>	1	.....S...T.E.....	.....N...II.....G.V...
<i>Oreochromis niloticus</i>	1	.....S...T.E.....	.....N...II.....G.V...
<i>Sciaenops ocellatus</i>	1	.....S...T.E.....	.....N...II.....V...
<i>Larimichthys crocea</i>	1	.....S...T.E.....	.....N...II.....V...
<i>Epinephelus coioides</i>	1	.....ST...T.E.....	.....N...II.....V...
<i>Sparus aurata</i>	1	.....S...T.E.P.....	.....NC.II.....V...
<i>Monopterus albus</i>	1	.....S...T.E.....	.....N...II.....Q.VD..K
<i>Oncorhynchus tshawytscha-1</i>	1	M.N.DGT.LPDER.....L...	.....N.SIV.V.....K.....H.F...
<i>Oncorhynchus mykiss-1</i>	1	M.N.DGT.LPDER.....L...	.....N.SIV.V.....K.....H.F...
<i>Oncorhynchus tshawytscha-2</i>	1	M.N..GT.LSDER.....V...	.....N.SIV.....Q.....K.....H.F...
<i>Oncorhynchus mykiss-2</i>	1	M.N..GT.LPDER.....L...	.....N.SIV.....Q.....K.....H.F...
<i>Clarias batrachus</i>	1	MMD...EA.LP.ERK...S...PLS.	.....N.SIEA.AG.D...K.....HT...
<i>Catostomus catostomus-1</i>	1	MIN...D.LP.EH...S...PLS.	.....N.SIEA.T.D...K.....H.F...
<i>Catostomus discobolus-1</i>	1	MIN...D.LP.EH...S...PLS.	.....N.SIEA.T.D...K.....H.F...
<i>Catostomus discobolus-2</i>	1	MIN...D.LP.ER...S...PLS.	.....N.SIEA.T...K.M...R.F...
<i>Catostomus discobolus-2</i>	1	MIN...D.LP.ER...S...PLS.	.....N.SIEA.P.D...K.M...R.F...
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	1	MIN...D.LP.ER...S...PLS.	.....N.SIEA.TG.D...K.....R.F...
<i>Cyprinus carpio</i>	1	MIN...DN.LP.ER...S...PLS.	.....N.SIEA.TG.D...K.M...R.F...
<i>Danio rerio</i>	1	MIN...EG.MP.ER...S...PLS.	.....N.SIET.TG.D...K.M...R.F...
<i>Anguilla anguilla</i>	1	IYKE...R.IPP.AH...S.TSPLAG	.....Y.SIPT.TG.D...EK.DGY.R.SA.Q.V
<i>Huso huso</i>	1	IYK...RTYVPDE...HSS.NSPSA	.....Y.ETIPA.TG.D.A.QR.DVE.QF.LA.Q.I
<i>Platichthys stellatus</i>	61	FSSRFVLVAG—FAVRT—QVTSKLSLKTGLMKLIEANQDQASGFSESSVIQLTPYGN	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	61	F.....S.....	.....M.L.....G.....L.....
<i>Scophthalmus maximus</i>	61	...S.IG.—S.P.F—IP.E.....	.....ILL.....E.PD.AL.A.T
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	60	.IH.ITWN—LFP.N—LHR.D.K.IQM...S—EMS-D.ITLPV..F.	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	61	.P..S.SV.—P.A.N—ISP.....	.....ILL.G.....EM.PD.TL.A...
<i>Odontesthes bonariensis</i>	61	.P...SG.—S.P.—ISP.....	.....ILL.R...P.EI..DP.GP.VPS...
<i>Oreochromis niloticus</i>	61	.P..S.SG.—SSL.N—ISPR.....	.....ILL.R...E.ENYPDTJTL.HA...
<i>Sciaenops ocellatus</i>	61	.P..S.SG.—S.P.N—ISP...D...	.....ILL.R...EI.PD.TL.A...
<i>Larimichthys crocea</i>	61	.P..S.SG.—S.P.N—ISP.....	.....M.ILL.R...A.EI.PDN.AL.A...
<i>Epinephelus coioides</i>	61	.P..S.SG.—S.P.N—ISP.....	.....ILL.R...EL.PD.AL.A...
<i>Sparus aurata</i>	61	.P..S.SG.—S.P.N—ISP.....	.....IHL.R.E...EI.PDR.AL.A...
<i>Monopterus albus</i>	61	.P.HS.SG.—S.L.N—ISP.....	.....ILL.R...EI.DN.AL.A.VS
<i>Oncorhynchus tshawytscha-1</i>	61	YP.QT.IISNS—L.M..NAN.ISE..D.V.INL..QGS..LLSLDDNDSQ..P...	
<i>Oncorhynchus mykiss-1</i>	61	YP.QT.IISNS—L.M..NAN.ISE..D.V.INL..TGS..VLSLDDNDSQ..P...	
<i>Oncorhynchus tshawytscha-2</i>	61	YP.QT.TISNS—L.M..NSN.ISE..D.V.INL..KGS..VLSLDDNDSLH.P...	
<i>Oncorhynchus mykiss-2</i>	61	YP.QT.TISNS—L.M..NSN.ISE..D.V.INL..KGS..VLSLDDNDSQH.P...	
<i>Clarias batrachus</i>	61	.P.KS.—GNPNHISE..AD.M.ISV..GCE..QASLD.NDAFAP—FED	
<i>Catostomus catostomus-1</i>	61	YT.QT.SGTYSNSLTIGNPS.I.E..AD.V.INV..KGYL..QPNMDDNDSL.P.—FED	
<i>Catostomus discobolus-1</i>	61	YT.QT.SGTYSNSLTIGNPS.I.E..AD.V.INV..KGYL..QPNMDDNDSL.P.—FEE	
<i>Catostomus catostomus-2</i>	61	.P.QT.SGTYSNSLT.GNPN.I.E..AD.V.ISV..KGC.L..QPNMDDNDSL.P.—FED	
<i>Catostomus discobolus-2</i>	61	.P.QT.SGTYSNSLT.GNPN.I.E..AD.V.ISV..KGC.L..QPNMDDNDSL.P.—FED	
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	61	YP.QT.SGTYSNSLTIGNPS.I.E..AD.V.ISV..KGC.L..QPNMDDNDSL.P.—FED	
<i>Cyprinus carpio</i>	61	.P.QT.SGAVNSLT.GNPN.I.E..AD.V.ISV.VKGC.L..QPNMDDNDSL.P.—FED	
<i>Danio rerio</i>	61	.P.QT.SSTISNSLTIGNPNLI.E..VD..M.ISV..KGC.L..QPNMDDNDSL.P.—FED	
<i>Anguilla anguilla</i>	61	YPLKT.SDAFNSNLMFG.SDGIFD..ED.NK.INE.MKVVG..GIYI—EDVRKLR.E	
<i>Huso huso</i>	61	SPLQS.SRVFTNSLVFS.SDR.FE..KD.EE.IVA.WRDLGE.GF.S—TLCLKT.DK	
<i>Platichthys stellatus</i>	115	YYQSVGVDESFRNRYELFA	CKKDMHKVETYLTVAK
<i>Paralichthys olivaceus</i>	114	.....S.....	.....F.....
<i>Scophthalmus maximus</i>	115	.H.F.A.....	.....P.....I.....
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	112	F.ENL.GN..QK.....L.....	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	115	...L.A...L.T...L.....	
<i>Odontesthes bonariensis</i>	115	...L.A...L.T...L.....	
<i>Oreochromis niloticus</i>	115	...L.GN..L.QT...L.....	
<i>Sciaenops ocellatus</i>	115	...LSG...L.T...L.....	
<i>Larimichthys crocea</i>	115	...LSGE..L.T...L.....	
<i>Epinephelus coioides</i>	115	...L.A...L.T...L.....	
<i>Sparus aurata</i>	115	...L.T...L.T...L.....	
<i>Monopterus albus</i>	115	.D..L.A..PL..T.D.L.....	
<i>Oncorhynchus tshawytscha-1</i>	119	...NL.G.GNV.....L.....	.....K.L.....
<i>Oncorhynchus mykiss-1</i>	119	...NL.G.GNV.....L.....	.....K.L.....
<i>Oncorhynchus tshawytscha-2</i>	119	...NL.G.GNV.....L.....	.....K.L.....
<i>Oncorhynchus mykiss-2</i>	119	...NL.G.GNV.....L.....	.....KYL.....
<i>Clarias batrachus</i>	110	F..TLS—EGNL.KSFR.LS.....	.....S.....R.LDS.....
<i>Catostomus catostomus-1</i>	120	F.LTM.—ENNL.ESF.....	
<i>Catostomus discobolus-1</i>	120	F.LTL.—ESNL.ESFH.....	
<i>Catostomus catostomus-2</i>	120	F.LTM.—ES.L.ESFR.L.....	.....R..N..R.....
<i>Catostomus discobolus-2</i>	120	F.LTM.—ES.L.ESFR.L.....	.....R..N..R.L.....
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	120	F.LTL.—ENNL.ESFR.L.....	.....R..N..R.LDS.....
<i>Cyprinus carpio</i>	120	F.LTL.—ENNL.ESFR.L.....	.....R..N..R.LDS.....
<i>Danio rerio</i>	120	F.LT.—ET.L.ESFR.L.....	.....R..N..R.LDS.....
<i>Anguilla anguilla</i>	118	FDVHLRN.AGLMK..G.L.....	.....K.T...RFV.S.....
<i>Huso huso</i>	118	FDVNLRN.DALFK..G.LS.....	.....K.M...RFV.S.....

图 2 星突江鲈与其他鱼类的 GH 氨基酸序列比较

4 个保守的半胱氨酸用方框表示

Fig. 2 Comparison of the amino acid sequences between *P. stellatus* GH gene and the other fish species

Four conserved Cys are boxed

利用 Clustalx 2.0.12 对星突江鲮 GH 基因的氨基酸序列与其他鱼类的 GH 氨基酸序列进行了比较(图 2)。结果发现,星突江鲮与其他鱼类 GH 的氨基酸序列中存在 4 个高度保守的半胱氨酸残基形成的 2 对二硫键,并且在近 C-末端区域序列高度保守,仅在亚口鱼科 GH 亚基 1 中发现缺失后 3 个半胱氨酸残基。

### 2.3 星突江鲮 GH 的系统进化分析

利用 MEGA 5.1 软件构建了星突江鲮 GH 基因和其他脊椎动物的系统进化树(图 3),结果显示,星突江鲮与除鳗鲡目、鲟形目外的其他硬骨鱼类聚为一个大的分支,与鲮形目和鲟形目鱼类聚为一个小的分支。

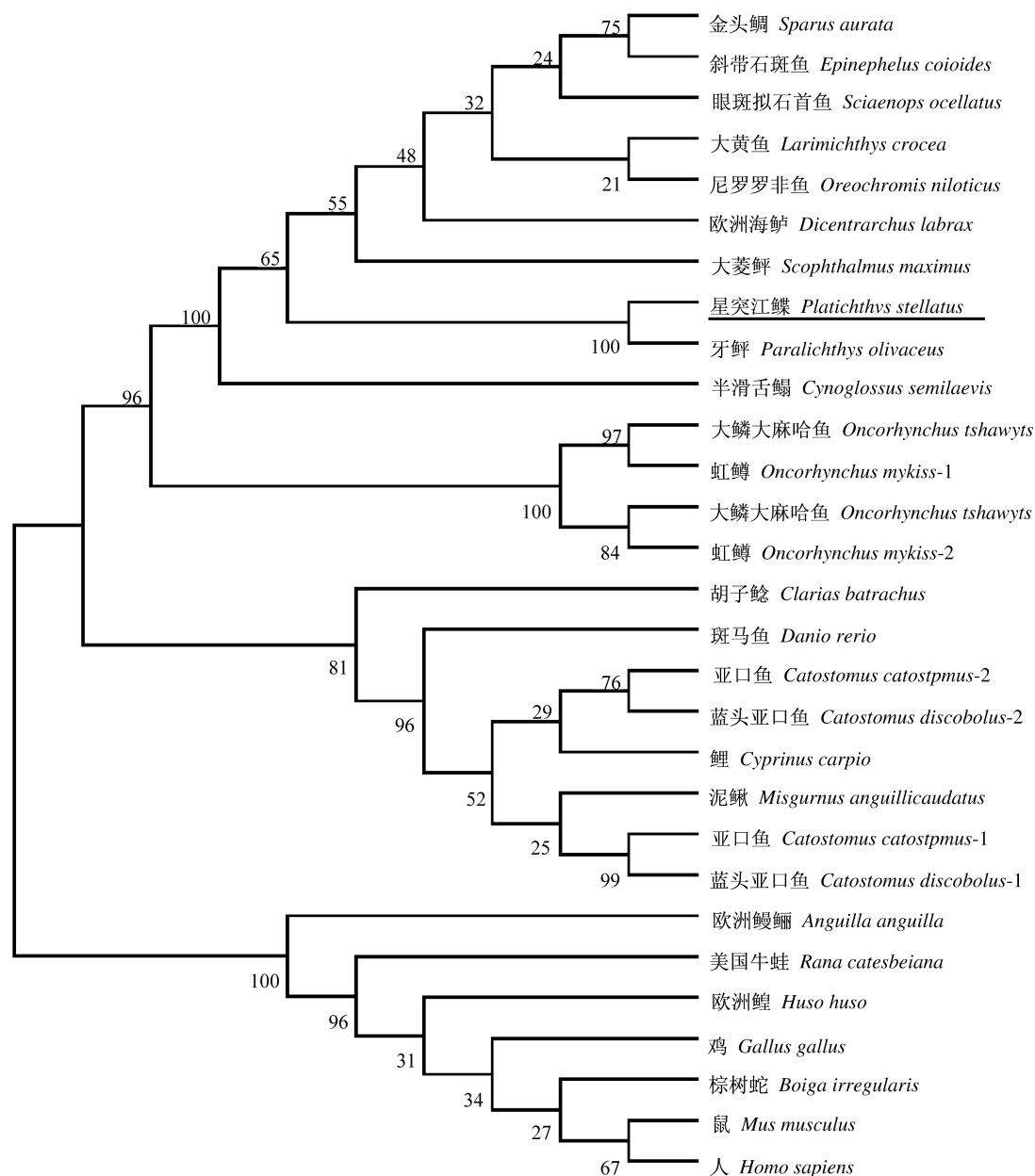


图 3 基于 GH 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

星突江鲮用下划线表示,建树物种 GH 氨基酸序列号见表 2

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on GH amino acid sequences

*Platichthys stellatus* is single underlined and GenBank accession numbers are showed in Tab. 2

## 2.4 星突江鲮 GH 基因 mRNA 的组织表达特性

荧光定量 PCR 结果显示(图 4),星突江鲮 GH 基因 mRNA 主要在垂体中表达,脑、性腺、肝脏、胃和肌肉中也可检测到少量表达,而鳃、心脏、头肾、肾脏、肠和幽门盲囊中未检测到表达。雌鱼胃和肌肉中 GH 基因 mRNA 表达水平显著高于雄鱼( $P < 0.05$ )。

## 2.5 GH/pET28a 重组质粒的构建

测序结果显示重组质粒 GH/pET28a(图 5)构建成功,重组菌将表达包含 221 个氨基酸的重组蛋白,利用 DNASTAR 预测其分子量为 24.9 ku,等电点为 8.438,其中包括 GH 成熟肽和 N 端的  $6 \times \text{His}$  标签,可进行诱导和蛋白纯化。

## 2.6 GH 重组蛋白的表达和 Western-blotting 验证

重组表达菌 IPTG 诱导后经 SDS-PAGE 检测显示在 15 和 25 ku 之间出现特异性条带,而对照菌和未经诱导的重组菌均未出现,此条带即 GH 重组蛋白,大小为 24.9 ku。通过对诱导时间、诱导温度和 IPTG 诱导浓度条件的优化,得到重组 GH 表达的最优条件为  $37^\circ\text{C}$  条件下 IPTG ( $1.0 \text{ mmol/L}$ ) 诱导 6 h,此条件下重组蛋白表达量占细菌总蛋白的 42.7%。

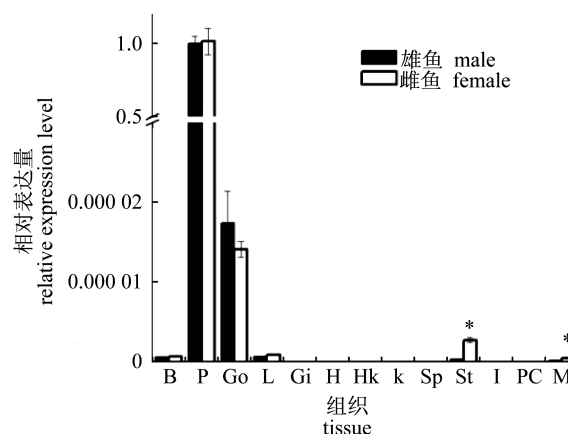


图 4 星突江鲮 GH 基因 mRNA 在雌雄鱼不同组织中的表达水平

以雌鱼垂体中的 GH mRNA 表达量为标准 1。\* 表示雌雄之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。B. 脑; P. 垂体; Gi. 鳃; H. 心脏; HK. 头肾; K. 肾脏; L. 肝脏; Sp. 脾脏; St. 胃; I. 肠; Go. 性腺; M. 肌肉

Fig. 4 Spatial expression pattern of GH mRNA in female and male *P. stellatus*

A relative abundance of 1 was set arbitrarily for the GH mRNA expression level in the pituitary of the females. The asterisk indicates the significant difference in expression levels of GH mRNA relative expression levels between females and males. B. brain; P. pituitary; Gi. gill; H. heart; HK. head kidney; K. kidney; L. liver; Sp. spleen; St. stomach; I. intestine; Go. gonad; M. muscle

```

ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC
      H H H H H H H
AGC CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGC GGA TCC CAG CCA
                        BamH I Q P
ATC ACA GAG AAC CAG CGT CTG TTC TCG ATC GCA GTT GGT CGA GTT CAG TAT CTT
I T E N Q R L F S I A V G R V Q Y L
CAC CTG GTT GCT AAG AAA CTC TTC AGT GAC TTC GAG AAC TCT CTA CAG TTG GAG
H L V A K K L F S D F E N S L Q L E
CGT CAA CTC AAC AAA ATC TTT TTA CAA GAT TTT TGT CAT TCT GAT TCT GAT TAT
D Q R Q L N K I F L Q D F C H S D Y
TTC TTG AGT CCG ATC GAC AAA CAT GAG ACA CAA CGC AGC TCA GTT TTG AAG CTG
F L S P I D K H E T Q R S S V L K L
TTA TCG ATC TCT TAT CGA TTG ATT GAG TCC TGG GAG TTC TCC AGT CGC TTC CTG
L S I S Y R L I E S W E F S S R F L
GTC GCA GGT TTC GCT GTG AGG ACC CAG GTT ACG TCC AAA CTG TCG GAG CTG AAG
V A G F A V R T Q V T S K L S E L K
ACA GGA CTC ATG AAA CTG ATT GAG GCC AAT CAG GAC GGA GCG AGT GGA TTC TCT
T G L M K L I E A N Q D G A S G F S
GAG AGC TCG GTG ATC CAG CTC ACG CCG TAC GGA AAC TAC TAC CAG AGC GTC GGA
E S S V I Q L T P Y G N Y Y Q S V G
GTC GAT GAG TCA TTC AGA CGA AAC TAC GAA CTG TTC GCC TGC TTT AAA AAG GAT
V D E S F R R N Y E L F A C F K K D
ATG CAC AAG GTG GAG ACG TAT CTG ACC GTG GCC AAA TGC CGA CTC TCT CCA GAA
M H K V E T Y L T V A K C R L S P E
GCT AAC TGC ACC CTG TAG AAG CTT
A N C T L * Hind III
  
```

图 5 星突江鲮 GH 重组成熟肽序列

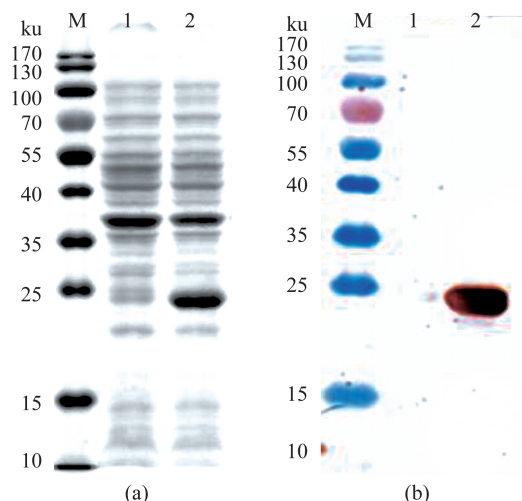
阴影部分示起始密码子 ATG, \* 表示终止密码子 TAG, 双下划线部分为  $6 \times \text{His}$  标签, 方框表示限制性内切酶位点 BamH I, Hind III, 单下划线部分为星突江鲮 GH 成熟肽

Fig. 5 The recombinant matured peptide sequence of GH of *P. stellatus*

The initiation codon (ATG) is shaded. The stop codon (TAG) is marked by asterisk. The  $6 \times \text{His}$  tag is double underlined. The endonuclease BamH I and Hind III are boxed, and the mature peptide is single underlined



采用 Western-blotting 免疫印迹方法,对 37 °C 下用 1.0 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的重组菌进行检测,结果显示,在 PVDF 膜上印迹单一,大小约 24.9 ku(图 6),说明重组菌表达的目的蛋白能被 6 × His 抗体特异性识别,具有抗原活性。



**图 6 星突江鲮重组 GH 蛋白的 Western-blotting 检测**  
M. 蛋白 Marker; 1. 37 °C 条件下 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 的对照菌(空载 pET-28a 质粒); 2. 37 °C 条件下 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 的重组 GH 表达菌  
(a) 考马斯亮蓝染色对照; (b) Western-blotting 检测结果

**Fig. 6 Western-blotting analysis of *P. stellatus* recombinant GH protein**

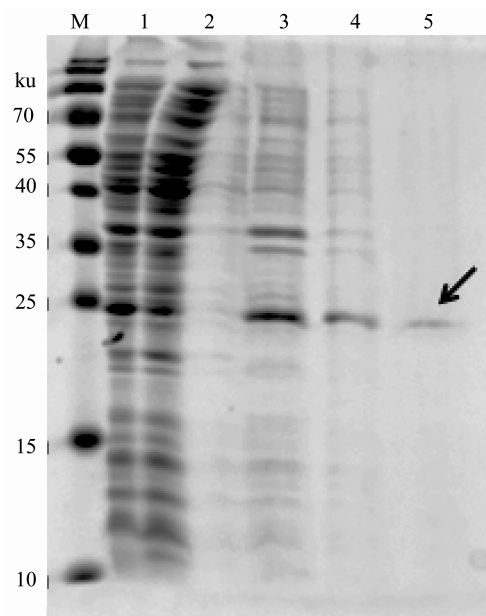
M. Marker, 1. control at 37 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 2. recombinant GH protein at 37 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG

(a) control of coomassie brilliant blue staining, (b) Western-blotting analysis

## 2.7 GH 重组蛋白的纯化和生物活性验证

分别取 37 °C 下 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 的重组 GH 表达菌,超声波破碎后的菌液沉淀和上清,0.45 μm 滤膜过滤后的蛋白液以及 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱分离出的蛋白液进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果显示重组菌所表达的蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中,通过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱可对重组蛋白进行有效的分离纯化,纯化的蛋白可见单一条带,相对分子质量约为 24.9 ku,与预期大小相符合(图 7)。

利用 MTT 法检测不同浓度的重组星突江鲮 GH 蛋白对人胚胎肾细胞 HEK293T 增殖的影响(图 8),5.4 μg/mL 重组 GH 蛋白能显著抑制人胚胎肾细胞 HEK293T ( $P < 0.01$ ),浓度为 16.2 μg/mL 时抑制效果更为明显( $P < 0.01$ )。

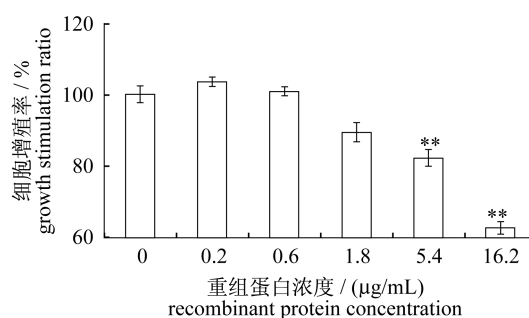


**图 7 星突江鲮重组 GH 蛋白的纯化**

M. 蛋白 Marker; 1. 37 °C 条件下 1.0 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的重组 GH 表达菌蛋白; 2. 超声波破碎后上清液; 3. 超声波破碎后沉淀; 4. 0.45 μm 过滤膜过滤后蛋白液; 5. Ni<sup>2+</sup> 离子纯化柱纯化后蛋白液(箭头示 24.9 ku 重组蛋白)

**Fig. 7 Purification of *P. stellatus* recombinant GH protein**

M. protein weight marker; 1. recombinant GH protein at 37 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG; 2. supernatant after ultrasonic disruption; 3. precipitation after ultrasonic disruption; 4. protein after 0.45 μm filtration; 5. protein after Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography column purification (the arrow indicates recombinant GH protein)



**图 8 重组星突江鲮 GH 蛋白对人胚胎肾细胞 HEK293T 增殖率的影响**

GSR (growth stimulation ratio) 用平均值 ± 标准差 (means ± SD) 来表示 ( $n = 4$ ); \*\* 与对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ )

**Fig. 8 Effects of recombinant GH protein from *P. stellatus* on the proliferation of human embryo kidney cell HEK293T**

GSR are shown as means ± SD ( $n = 4$ ); \*\* significantly different from control at  $P < 0.01$

### 3 讨论

本研究通过 RACE 克隆技术获得了星突江鲮 GH 基因的 cDNA 序列全长,编码包含 204 个氨基酸的前体肽,通过剪切信号肽形成包含 180 个氨基酸的成熟肽而发挥作用。成熟肽中 4 个保守的半胱氨酸残基参与形成 2 对二硫键(第 69 位与第 177 位,第 194 与第 202 位),对于蛋白质空间结构的维持具有重要意义<sup>[21]</sup>。氨基酸序列比对发现,硬骨鱼类 GH 在 C 端区存在高度保守片段,可能对于 GH 与相应受体的结合以及蛋白质结构的维持具有重要作用<sup>[22-23]</sup>。此外,星突江鲮 GH 在 C 端存在一个糖基化位点 Asn-Cys-Thr,在其他鲮形目鱼类 GH 中也仅发现这一个 C 端糖基化位点,而在鲤形目和鲑形目鱼类的 GH 则发现存在两个 N-糖基化位点<sup>[24]</sup>,糖基化可能涉及到蛋白相应生物作用的发挥,不同鱼种间糖基化位点的差异还有待进一步研究。鲑科<sup>[25]</sup>和亚口鱼科<sup>[26]</sup>均发现有 2 个 GH 亚基,可能是由基因组的复制产生。

实时定量 PCR 结果表明,星突江鲮 GH 基因 mRNA 主要在垂体中表达,GH 通过内分泌调节的方式影响下游靶器官以及靶细胞的生理功能。另外,在脑、性腺、胃和肌肉中也检测到少量 GH 基因 mRNA 的表达,这种垂体外 GH 基因 mRNA 表达的模式在虹鳟<sup>[27]</sup>、斜带石斑鱼<sup>[28]</sup>、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[29]</sup>等鱼类中也有出现,暗示 GH 还可能通过自分泌和旁分泌的方式参与生长发育调节。星突江鲮雌鱼生长速度高于雄鱼,本研究 GH 基因 mRNA 在雌雄鱼垂体中表达量差异并不显著,而 Ma 等<sup>[29]</sup>在具有相同雌雄生长差异特性的半滑舌鳎研究中发现雌鱼垂体 GH 基因 mRNA 表达量显著高于雄鱼,这种差异可能与物种特异性有关,而且其他生长相关激素(如 IGFs)的表达差异也可能造成影响<sup>[30]</sup>,因此,推测 GH 可能并不直接通过内分泌形式参与这种性别差异的生长调节。同时发现,雌性胃和肌肉中 GH mRNA 的表达量高于雄性,已有证据也表明,GH 可直接与肌肉等器官上的受体结合而影响细胞营养物质的合成代谢与生长发育<sup>[31]</sup>,上述证据提示,星突江鲮肌肉中 GH 可能以旁分泌和自分泌的方式参与到性别二态性的生长差异调节。

Breier 等<sup>[4]</sup>研究表明,GH 能够刺激多种前体

细胞的分化,并且促进分化的细胞进行有丝分裂而导致细胞数量的增加。Leung 等<sup>[32]</sup>利用外源 GH 诱导 sea bream 体外培养肝脏细胞发现 IGF-I mRNA 表达量显著升高,说明 GH 可通过 IGF-I 作用于细胞增殖。本实验通过原核表达系统获得的重组 GH 蛋白经纯化复性后,未表现出明显的促细胞增殖效应,仅在较高浓度时具有显著抑制人胚胎肾细胞 HEK293T 增殖的作用,可能有以下 4 个原因:①星突江鲮 GH 成熟肽中包含一个糖基化位点,大肠杆菌表达系统无法实现蛋白糖基化而影响了重组蛋白的活性,因而未表现出促进细胞增殖作用;②星突江鲮 GH 的生长调节作用可能不是通过细胞水平而直接实现,而是通过旁通路实现,有待于今后进一步研究确定;③实验所用重组蛋白浓度范围超出了适宜水平,而未表现出促增殖效应;④除蛋白质本身的生物学作用外,重组蛋白纯化和复性过程中遗留的化学物质可能在一定程度上影响细胞的增殖。

本实验通过 RACE 技术获得了星突江鲮 GH 基因 cDNA 全长序列,利用实时荧光定量 PCR 技术对 GH 基因 mRNA 在星突江鲮雌雄组织表达特性进行了分析,并成功构建了 GH 原核表达系统,获得了高纯度的星突江鲮 GH 重组蛋白,为 GH 在星突江鲮生长调控机制的研究提供了基础材料。

#### 参考文献:

- [1] Yowe D L, Epping R J. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes [J]. *Gene*, 1995, 162(2): 255 - 259.
- [2] Møller N, Copeland K C, Nair K S. Growth hormone effects on protein metabolism [J]. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2007, 36(1): 89 - 100.
- [3] Cook J T, Mcniven M A, Sutterlin A M. Metabolic rate of pre-smolt growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 2000, 188(1): 33 - 45.
- [4] Breier B H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 1999, 17(2): 209 - 218.
- [5] Sakamoto T, Shepherd B S, Madsen S S, et al. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost [J]. *General and*

- Comparative Endocrinology, 1997, 106 ( 1 ): 95 - 101.
- [ 6 ] Benedet S, Andersson E, Mittelholzer C, *et al.* Pituitary and plasma growth hormone dynamics during sexual maturation of female Atlantic salmon [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 167(1) : 77 - 85.
- [ 7 ] Li W S, Chen D, Wong A O, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 144(1) : 78 - 89.
- [ 8 ] Johansson V, Winberg S, Jönsson E, *et al.* Peripherally administered growth hormone increases brain dopaminergic activity and swimming in rainbow trout [ J ]. Hormones and Behavior, 2004, 46 ( 4 ): 436 - 443.
- [ 9 ] Yada T, Nagae M, Moriyama S, *et al.* Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 115(1) : 46 - 52.
- [ 10 ] Habibi H R, Ewing E, Bajwa R, *et al.* Gastric uptake of recombinant growth hormone in rainbow trout [ J ]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28 : 463 - 467.
- [ 11 ] Zhang X C, Liu S M, Zang X N. Study on the heterogenous expression, application and safety of fish growth hormone [ J ]. Periodical of Ocean University of China: Natural Sciences, 2008, 37(6) : 939 - 946. [ 张学成, 刘顺梅, 臧晓南. 鱼类生长激素的异源表达、应用及安全性评价. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 37(6) : 939 - 946. ]
- [ 12 ] Sekine S, Mizukami T, Nishi T, *et al.* Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli* [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985, 82(13) : 4306 - 4310.
- [ 13 ] Xu M H, Long L N, Wang Y R, *et al.* Cloning and differential expression of growth hormone in *Pelteobagrus vachelli* [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5) : 652 - 662. [ 徐敏华, 龙丽娜, 王悦如, 等. 瓦氏黄颡鱼生长激素基因克隆及其组织特异性表达分析. 水产学报, 2012, 36(5) : 652 - 662. ]
- [ 14 ] Chen D, Yang F, Wang W, *et al.* Intracellular expression of *Latrolabrox japonicus* growth hormone in methyltrophic yeast, *Pichia pastoris* [ J ]. Progress of Biochemistry and Biophysics, 1998, 25(2) : 140 - 143. [ 陈丹, 杨丰, 王伟, 等. 鲈鱼生长激素在甲醇酵母中的胞内表达. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(2) : 140 - 143. ]
- [ 15 ] Wang W, Chen D, Yang F. Intracellular expression of *Latrolabrox japonicus* growth hormone in methyltrophic yeast, *Pichia pastoris* [ J ]. Progress of Biochemistry and Biophysics, 2003, 30(4) : 301 - 306. [ 王伟, 孙永华. 草鱼生长激素在毕赤酵母中的高效分泌表达. 遗传学报, 2003, 30(4) : 301 - 306. ]
- [ 16 ] Li Y, Bai J, Jian Q, *et al.* Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [ J ]. Aquaculture, 2003, 216(1) : 329 - 341.
- [ 17 ] Mai A J, Zhuang Z M, Li C, *et al.* The biologic characteristics of starry flounder (*Platichthy stellatus* Pallas) [ J ]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(5) : 91 - 95. [ 马爱军, 庄志猛, 李晨, 等. 星突江鲈生物学特性及养殖前景. 海洋水产研究, 2006, 27(5) : 91 - 95. ]
- [ 18 ] Liu Z H, Wang B, Yao Z G, *et al.* Morphological development and growth of larval and juvenile fish of starry flounder, *Platichthy stellatus* [ J ]. Advances in Marine Science, 2008, 26(1) : 90 - 97. [ 刘振华, 王波, 姚振刚, 等. 星斑川鲈仔、稚、幼鱼的形态发育与生长. 海洋科学进展, 2008, 26(1) : 90 - 97. ]
- [ 19 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [ J ]. Methods, 2001, 25(4) : 402 - 408.
- [ 20 ] Liu Z L, Xu Y J, Liu X Z, *et al.* Prokaryotic expression and bioactivity analysis of insulin-like growth factor-I from *Cynoglossus semilaevis* Günther [ J ]. Journal of Fishery Science of China, 2013, 20(4) : 1 - 7. [ 刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鲷类胰岛素生长因子-I的原核表达及活性分析. 中国水产科学, 2013, 20(4) : 1 - 7. ]
- [ 21 ] Liu B, Zang X N, Liu S M, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and phylogenetic characterization of growth hormone cDNA from *Scophthalmus maximus* [ J ]. Periodical of Ocean University of China: Natural Sciences, 2008, 38(5) : 726 - 732. [ 刘滨, 臧晓南, 刘顺梅, 等. 大菱鲆生长激素基因cDNA的克隆、序列分析及分子系统研究 [ J ]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 38(5) : 726 - 732. ]
- [ 22 ] Venkatesh B, Brenner S. Genomic structure and

- sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes [J]. *Gene*, 1997, 187 (2): 211 - 215.
- [23] Devlin R H, Yesaki T Y, Biagi C A, *et al.* Extraordinary salmon growth [J]. *Nature*, 1994, 371 (6494): 209 - 210.
- [24] Liu B, Zang X N, Liu S M, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the growth hormone cDNAs from seven Pleuronectiformes fishes [J]. *Journal of Wuhan University: Nature and Science Edition*, 2008, 54 (4): 485 - 491. [刘滨, 臧晓南, 刘顺梅, 等. 7 种鲮形目鱼类生长激素基因 cDNA 序列的克隆及系统分析 [J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2008, 54 (4): 485 - 491.]
- [25] McKay S J, Trautner J, Smith M J, *et al.* Evolution of duplicated growth hormone genes in autotetraploid salmonid fishes [J]. *Genome*, 2004, 47 (4): 714 - 723.
- [26] Bart H L, Reneau P C, Doosey M H, *et al.* Evolutionary divergence of duplicate copies of the growth hormone gene in suckers (*Actinopterygii: Catostomidae*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11 (3): 1090 - 1102.
- [27] Biga P R, Schelling G T, Hardy R W, *et al.* The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 135 (3): 324 - 333.
- [28] Li W S, Chen D, Wong A O, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 144 (1): 78 - 89.
- [29] Ma Q, Liu S, Zhuang Z, *et al.* Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Gene*, 2012, 493 (1): 92 - 104.
- [30] Butler A A, Roith D L. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles [J]. *Annual Review of Physiology*, 2001, 63 (1): 141 - 164.
- [31] Dunshea F R, Harris D M, Bauman D E, *et al.* Effect of porcine somatotropin on *in vivo* glucose kinetics and lipogenesis in growing pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 1992, 70 (1): 141 - 151.
- [32] Leung L Y, Kwong A K Y, Man A K Y, *et al.* Direct actions of cortisol, thyroxine and growth hormone on IGF-I mRNA expression in sea bream hepatocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151 (4): 705 - 710.

## Molecular cloning and *in vitro* expression of growth hormone gene from *Platichthys stellatus*

ZANG Kun<sup>1,2</sup>, LIU Xuezhou<sup>1\*</sup>, XU Yongjiang<sup>1</sup>, ZHANG Kai<sup>3</sup>,  
SHI Bao<sup>1</sup>, SHI Xueying<sup>1,2</sup>, LI Cunyu<sup>1,2</sup>

- (1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;  
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;  
3. Qingdao BeiBao Marine Science and Technology Co., Ltd., Qingdao 266000, China)

**Abstract:** The full-length cDNA encoding growth hormone (GH) was isolated from the pituitary of *Platichthys stellatus* using RACE (rapid amplification of cDNA ends) method. Results showed that *Platichthys stellatus* GH cDNA sequence is 957bp in length and encodes 204 amino acids. The highest amino acid identity of *Platichthys stellatus* GH was 73.0% with *Paralichthys olivaceus*. Phylogenetic analysis indicated that *Platichthys stellatus* GH was clustered with other pleuronectiformes and perciformes species. The tissue expression patterns of GH mRNA in different tissues of female and male adults were analyzed by the quantitative real-time PCR. GH mRNA showed the highest expression level in the pituitary of both sexes with lower levels in the brain, gonad, liver, stomach and muscle. The expression levels of GH mRNA in the female stomach and muscle were significantly higher than those of males ( $P < 0.05$ ), which implied that it might be involved in sexually dimorphic growth pattern through paracrine and autocrine pathways. The GH/pET28a recombinant plasmid was successfully constructed and highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after being induced by IPTG with special fusion polypeptides containing His6 at their N-terminus. The obtained recombinant GH polypeptide was expressed in form of inclusion bodies with molecular weight of 24.9 ku and had the antigenicity to His6 antibody by western blotting analysis. The inclusion bodies were denaturalized using 6mol/L guanidine HCl, purified using Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography and annealed by gradient dialysis in urea, and the verified recombinant GH protein was obtained. The effect of recombinant GH protein on proliferation of human embryonic kidney cells HEK293T was tested, and the results showed that significant inhibition was only found when protein concentration was higher than 5.4 μg/mL. Results from the present study could provide basic knowledge for molecular-level and protein-level growth regulation mechanism study of *Platichthys stellatus*.

**Key words:** *Platichthys stellatus*; growth hormone; gene cloning; tissue expression; prokaryotic expression

**Corresponding author:** LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn