

半滑舌鲷黑色素聚集激素重组制备与生物活性分析

朱学武^{1,2}, 徐永江¹, 柳学周^{1,2*}, 史宝¹, 王滨¹, 李斌^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 根据半滑舌鲷黑色素聚集激素(MCH1)的cDNA序列设计特异性引物扩增成熟肽片段, 利用原核表达载体pET-32a成功构建了重组MCH1/pET32a质粒, 转化大肠杆菌BL21(DE3)后经IPTG诱导可产生N端含6个组氨酸的重组蛋白。半滑舌鲷MCH1重组蛋白大小为29.9 ku, 32 °C条件下以0.2 mmol/L IPTG诱导6 h时目的蛋白表达量最高, 占菌体总蛋白的49.8%。Western blotting免疫印迹表明, MCH1重组蛋白可被6×His抗体特异性识别。经Ni²⁺-NTA亲和柱纯化, 可获得高纯度的MCH1重组蛋白。采用垂体离体孵育方法测试蛋白活性, MCH1重组蛋白可有效刺激或抑制垂体MCH和MSH肽的分泌, MCH肽水平先上升后下降, 在100 nmol/L达到峰值, MSH肽水平显著升高。随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, 垂体MCH1和MCH2 mRNA表达都呈现先上升后下降的趋势, POMC-*a*和PACAP mRNA表达都呈现明显下降趋势, 而POMC-*b*、MCHR1、MCHR2、MITF基本没有变化, 表明获得的半滑舌鲷MCH1重组蛋白具有调节垂体激素分泌和基因表达的生理功能。本研究可为研制半滑舌鲷无眼侧黑化调控的专用生物制剂提供理论与技术依据。

关键词: 半滑舌鲷; 黑色素聚集激素; 原核表达; 生物活性

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

在鱼类中, MCH最初是作为一个体色调控的作用因子从大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)中分离鉴定出来的^[1]。在鲆鲽类体色调控作用方面, MCH的主要功能是抑制鲆鲽类等皮肤黑化进程, 或对黑化起到消褪作用。如外源MCH处理可令条斑星鲽(*Verasper moseri*)有眼侧皮肤黑化程度大为弱化, 同时脑中MCH mRNA的表达水平升高^[2], 表明外源MCH具有明显的黑化抑制作用。近年研究发现, 在星斑川鲽(*Platichthys stellatus*)对白色与暗色背景适应过程中, 其无眼侧体色和下丘脑中的MCH1、MCH2 mRNA水平都发生了明显的差异表达变化^[3], 另有研究证实, MCH1的功能是抑制无眼侧黑化^[4], 鱼类皮肤颜色变白的同时检测到MCH2表达量的增加^[5], 表明MCH1和MCH2均参与了鲆鲽类无眼侧黑化抑

制的调控过程。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是一种暖温性近海大型底层鱼类, 在我国沿海均有分布^[6], 是我国鲆鲽类养殖三大主导养殖种类之一, 也是我国重要的资源增殖鱼种^[7-8]。有关半滑舌鲷生长、繁殖等方面的研究已经取得了诸多进展^[9-10], 支撑了我国半滑舌鲷养殖产业的快速发展。但是, 随着养殖业的发展, 养殖半滑舌鲷无眼侧体色黑化的问题日益凸显, 该种无眼侧的黑化现象影响了其市场价格, 成为抑制半滑舌鲷养殖产业持续发展的瓶颈之一。本实验室前期的研究中已成功克隆了半滑舌鲷MCH基因, 完成了表达分析, 并在此基础上, 建立了半滑舌鲷黑化抑制因子-MCH1成熟肽的原核表达技术, 实现了MCH1重组蛋白的体外高效表达, 同时, 利

收稿日期: 2015-11-27 修回日期: 2016-05-10

资助项目: 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)

通信作者: 柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

用垂体离体孵育方法分析了重组半滑舌鲷MCH1蛋白生物活性, 以期为研制抑制半滑舌鲷无眼侧黑化的生物制剂提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用半滑舌鲷取自海阳市黄海水产有限公司, 3尾半滑舌鲷(全长25~30 cm、体质量350~630 g)用MS-222(300 mg/L)麻醉处死, 迅速取其垂体组织于液氮中速冻后转入-80℃保存, 用于总RNA提取和MCH1成熟肽克隆分析。

30尾半滑舌鲷(体长35~40 cm、体质量550~650 g)用MS-222(300 mg/L)麻醉处死, 迅速取其垂体组织于L15液体培养基中进行离体孵育, 用于MCH1重组蛋白功能的离体验证。

1.2 RNA提取和cDNA第一链的合成

利用RNAiso Plus(TaKaRa)提取垂体总RNA, 以1%琼脂糖凝胶电泳检测质量, 使用微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)检测浓度。利用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(TaKaRa)反转录合成cDNA第一链。

1.3 MCH1/pET32a重组质粒的构建

根据半滑舌鲷MCH1 cDNA序列(GenBank序列号: XP_008322511.1)和其他鱼类MCH成熟肽序列结构特点, 参照pET-32a载体上的多克隆位点排列特点, 选取Bam HI和Hind III作为酶切位点, 设计特异性引物。

MCH1-F:5'-ATAGGATCCCTGCCCATGATGACCAAAGACG-3'

MCH1-R:5'-ATAAAGCTTTTACACCTCCAGCACGGC-3'

在引物MCH1-F和MCH1-R的5'端分别加入了酶切位点BamH I和Hind III(方框标注), 在下游引物MCH1-R的5'端中加入强终止密码子TTA(单下划线标注)。MCH1成熟肽以垂体cDNA为模板进行PCR扩增, PCR条件: 94℃ 5 min变性, 94℃ 30 s、61℃ 30 s、72℃ 50 s 34个循环, 最后72℃延伸10 min。将扩增得到的成熟肽片段连接到pEASY-T1 Simple载体上, 挑选阳性克隆送往上海生工公司测序验证。

利用质粒小提试剂盒(TaKaRa)提取MCH1/pEASY-T1质粒, 用限制性内切酶BamH I和Hind

III(TaKaRa)将MCH1/pEASY-T1质粒和表达载体pET-32a双酶切, 使用T₄连接酶(TaKaRa)将双酶切后的目的片段连接到pET-32a上, 得到重组质粒MCH1/pET32a, 转化至大肠杆菌DH5α中, 菌液PCR验证后并测序。

1.4 重组MCH1/pET32a质粒在大肠杆菌中诱导表达

将测序正确的重组质粒转化到表达菌株BL21(Invitrogen), 挑取阳性单克隆接种于含Amp(100 μg/mL)的1 mL LB培养基中, 37℃振荡培养过夜。次日按1:100扩大培养至OD₆₀₀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2 mL菌液, 12 000 r/min离心10 min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。

将菌液分别在22、27、32、37和42℃条件下IPTG(1 mmol/L)诱导6 h取样进行SDS-PAGE电泳分析, 研究不同温度下重组载体蛋白表达的差异。

菌液在32℃条件下培养至OD₆₀₀值为0.6~0.7时, 加入IPTG使其终浓度分别为0、0.1、0.2、0.5、1.0和2.0 mmol/L诱导6 h取样进行SDS-PAGE电泳分析, 研究不同IPTG浓度对重组载体蛋白表达的诱导作用。

1.5 重组MCH1蛋白western blotting验证

收集诱导6 h的重组MCH1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×His Monoclonal Antibody为一抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗, 4℃下一抗孵育过夜, 接着室温下二抗孵育1 h, 使用HRP-DAB显色试剂(Solarbio)进行显色。

1.6 重组MCH1蛋白的分离和纯化

重组MCH1菌种按照1%接种到500 mL LB培养基中(含有100 μg/mL 氨苄霉素), 32℃条件下IPTG(0.2 mmol/L)诱导重组菌6 h后, 4℃、12 000 r/min离心10 min收集菌体, 每克菌体加入结合缓冲液(20 mmol/L Na₃PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)15 mL重悬菌体。在-80℃条件下反复冻融菌液3次, 冰浴进行超声破碎(800 W), 5 s超声, 5 s间隔, 破碎30 min左右。破碎后用

4 °C、12 000 r/min 离心10 min 收集上清液,先后用0.8和0.45 μm微孔滤膜过滤,然后Ni²⁺-NTA亲和层析柱(GE)分离纯化融合蛋白。用10 ku超滤管(Millipore)进行超滤浓缩,SDS-PAGE电泳检测,-80 °C超低温冰箱保存。利用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo)检测纯化后的重组蛋白浓度,0.22 μm膜过滤除菌备用。

1.7 重组MCH1蛋白生物活性检测

垂体孵育方法 以L15培养基清洗垂体组织,然后将整个垂体组织置于含10%小牛血清的L15培养液中培养6 h,之后在含有不同浓度MCH1重组蛋白(0、1、10、100和1 000 nmol/L)的无小牛血清的L15培养液中孵育,在CO₂细胞培养箱(Heal Force)中25 °C培养24 h,每组3个平行,培养结束后收集组织孵育液和垂体组织。

激素水平检测 利用鱼黑色素浓缩激素(MCH)ELISA试剂盒、鱼黑色素细胞刺激素(MSH)ELISA试剂盒(北京绿源博德)检测孵育液中MCH和MSH肽浓度。

试剂盒灵敏度 最低检测浓度小于0.1 ng/mL;特异性表现在不与其他可溶性结构类似物交叉反应;重复性表现在板内、板间变异系数均小于15%。MCH和MSH标准品线性回归与预期浓度相关系数R²值分别为0.9985和0.9994。

1.8 定量PCR分析

根据本实验室获得的半滑舌鳎阿黑皮素原(POMC-a和POMC-b)^[11]、黑色素聚集激素(MCH2)、黑色素聚集激素受体(MCHR1和MCHR2)和从NCBI下载的*pMCH1*(GenBank序列号:XP_008322511.1)、垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)(GenBank序列号:FJ608666.1)、小眼畸形相关转录因子(*MITF*)(GenBank序列号:XM_008319185.1)的cDNA序列分别设计定量引物,以18S为内参设计定量引物18S-DF和18S-DR,定量PCR所用各引物序列见表1。

利用Mastercycler ep realplex real-timePCR仪(Eppendorf),使用SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)试剂盒,PCR体系20 μL:cDNA模板2 μL,10 μmol/L的上、下游引物各0.8 μL,SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μL和ddH₂O 6.4 μL,采用两步法,POMC-a、MCH2、MCHR1、PACAP的PCR反应条件:95 °C预变性30 s,95 °C

表1 半滑舌鳎体色相关基因定量检测所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qPCR detection of hypermelanosis related genes

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	作用 usage
POMC-a-DF	TACATGGGAGCAGA	POMC-a Real-time PCR
POMC-a-DR	AGAGGAA AGCCACCAATAGCCA	
POMC-b-DF	CAGAG TGGACTGTGTTTCGTC	POMC-b Real-time PCR
POMC-b-DR	TGTGTC AGCGTTTGGTCTGAG	
MCH1-DF	GAGAG ATGCGTCCGTCCTG	MCH1 Real-time PCR
MCH1-DR	CTATC TGTCGTCGTCCTTGG	
MCH2-DF	TCATC AGCCTGGGTTTCGTTA	MCH2 Real-time PCR
MCH2-DR	CTGG TTTCCGTCGTCCTGCT	
MCHR1-DF	CTGTA CCAATCCGCTTCGAC	MCHR1 Real-time PCR
MCHR1-DR	TACAT GACCGCGTACATCA	
MCHR2-DF	ACAC GTGCATGATGTGGCT	MCHR2 Real-time PCR
MCHR2-DR	GGAC GTGGTAGAGGGTGA	
PACAP-DF	GGGAGTAGAA TTGTTTGCCCGTGAG	PACAP Real-time PCR
PACAP-DR	ACTG CACTCCTTTCCTGGC	
MITF-DF	TGAAG AGCAGCATTAGCATC	MITF Real-time PCR
MITF-DR	GTTAGC CTCTACGGACACGGC	
18S-DF	TTCA GGTCTGTGATGCCCT	18S Real-time PCR
18S-DR	TAGATGTC AGTGGGGTTCAGCGG	
	GTTAC	

5 s, 58 °C 20 s, 共40个循环; POMC-b、MCH1、MCHR2、MITF的PCR反应条件:95 °C预变性30 s,95 °C 5 s,60 °C 20 s,共40个循环。

定量PCR扩增根据标准曲线的相关系数(*r*²)和扩增效率(*E*)确定反应条件。实时定量标准曲线以垂体cDNA进行5倍梯度稀释成6个标准品进行制作。所有基因的标准曲线0.99<*r*²<0.999,0.85<*E*<1.1。

每一组织样品的分析进行3次平行实验,每次3个重复,PCR反应完成后观察熔解曲线以确定扩增特异性,每次均设置空白对照。以18S为内参,利用2^{-ΔΔC_t}的方法计算目的基因的相对表达量^[12]。

1.9 数据统计分析

实验数据采用SPSS(17.0版本)统计,对激素表达水平和基因的表达水平分别进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),设置差异显著性水

平 $P=0.05$ ，当 $P<0.05$ 时表示差异显著。

2 结果

2.1 MCH1/pET32a重组质粒的构建

将正确克隆的MCH1成熟肽序列插入到原核表达质粒pET-32a上，得到重组质粒MCH1/pET32a，转化到大肠杆菌BL21中，得到与预期大小相符的特异条带(图1)，菌液PCR检测片段长度应为1100 bp。

测序结果显示，重组质粒MCH1/pET32a构建成功。MCH1/pET32a重组质粒(图2)在大肠杆菌中将表达包含275个氨基酸的重组蛋白，分子量为29.9 ku，等电点为5.24。重组蛋白N端均含有6×His标签，可进行鉴定和蛋白纯化。

2.2 重组质粒在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达

将重组质粒MCH1/pET-32a转化入大肠杆菌BL21(DE3)进行诱导表达，SDS-PAGE电泳显示，经IPTG诱导的MCH1重组菌在25~30 ku出现

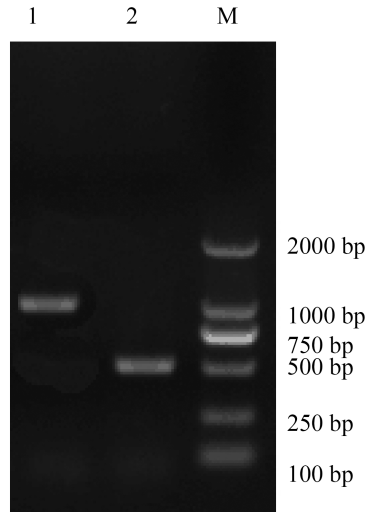


图1 半滑舌鲷MCH1重组表达菌BL21的菌液PCR鉴定
M.Marker, 下同; 1.MCH1重组表达菌; 2.对照菌(空载质粒pET-32a)

Fig. 1 PCR verification of MCH1/pET-32a recombinant plasmid in *E.coli* BL21 cells

M.DNA Marker, the same below; 1.*E.coli* BL21 containing MCH1/pET-32a recombinant plasmid, 2.control *E.coli* BL21 containing pET-32a

```

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

```

图2 半滑舌鲷MCH1重组成熟肽序列

阴影部分为起始密码子ATG，*表示终止密码子TAA，双下划线部分为6×His tag，方框表示限制性内切酶位点BamH I、Hind III

Fig. 2 The matured peptide sequence of MCH1 of *C. semilaevis*

The initiation codon (ATG) is shaded. The stop codon(TAA) is marked by asterisk. The 6×His tag is double underlined. The endonuclease BamH I and Hind III are boxed

特异性条带, MCH1重组蛋白大小为29.9 ku。SigmaScan pro 5软件分析显示, 不同诱导条件下的重组菌蛋白表达量不同, 通过对诱导时间、诱导温度和IPTG诱导浓度条件的优化, 得到重组表达的最优条件为32 °C、IPTG(0.2 mmol/L)诱导培养6 h, 重组蛋白表达量占细菌总蛋白的49.8%(图3~图5)。

2.3 MCH1重组蛋白的western blotting验证

采用western blotting免疫印迹方法对32 °C下

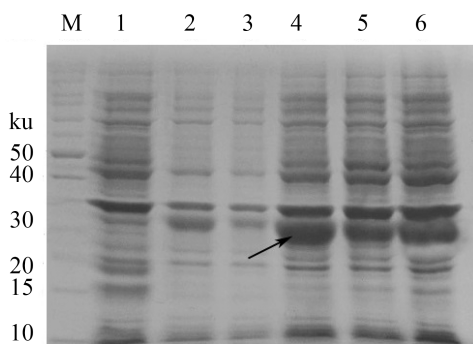


图3 温度对半滑舌鳎重组MCH1蛋白表达的影响

1. 诱导6 h的对照菌(空载pET-32a质粒); 2~6. 22、27、32、37、42 °C诱导6 h(IPTG浓度为1.0 mmol/L)的重组MCH1表达菌蛋白(箭头示29.9 ku重组蛋白)

Fig. 3 Effects of temperature on production of *C. semilaevis* recombinant MCH1 protein

1. control at 37 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 2-6. recombinant MCH1 at 22, 27, 32, 37 and 42 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG (the arrow indicates recombinant MCH1 protein)

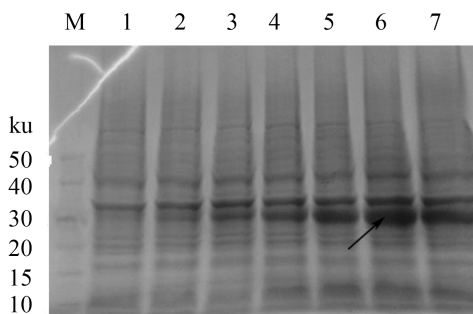


图4 诱导时间对半滑舌鳎重组MCH1蛋白表达的影响

1. 32 °C条件下1.0 mmol/L的IPTG诱导6 h的对照菌(空载pET-32a质粒); 2~7. 32 °C条件下1.0 mmol/L的IPTG诱导1、2、3、4、6、8 h的重组MCH1表达菌蛋白(箭头所指为29.9 ku重组蛋白)

Fig. 4 Effects of induction time on production of *C. semilaevis* recombinant MCH1 protein

1. control at 27 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 2-7. recombinant MCH1 at 32 °C post 1, 2, 3, 4, 6, 8 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG (the arrow indicates recombinant MCH1 protein)

0.2 mmol/L的IPTG诱导6 h的MCH1重组菌分别进行检测, 结果显示MCH1重组菌在PVDF膜上出现29.9 ku的单一印迹(图6), 说明重组菌表达的目

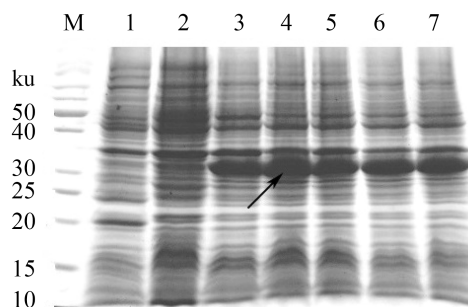


图5 IPTG浓度对半滑舌鳎重组MCH1蛋白表达的影响

1. 诱导6 h的对照菌(空载pET-32a质粒); 2~7. 32 °C条件下0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mmol/L的IPTG诱导6 h的重组MCH1表达菌蛋白(箭头所指为29.9 ku重组蛋白)

Fig. 5 Effects of IPTG concentrations on production of *C. semilaevis* recombinant MCH1 protein

1. control at 32 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 2-7. recombinant MCH1 at 32 °C post 6 hours of induction with 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L IPTG (the arrow indicates recombinant MCH1 protein)

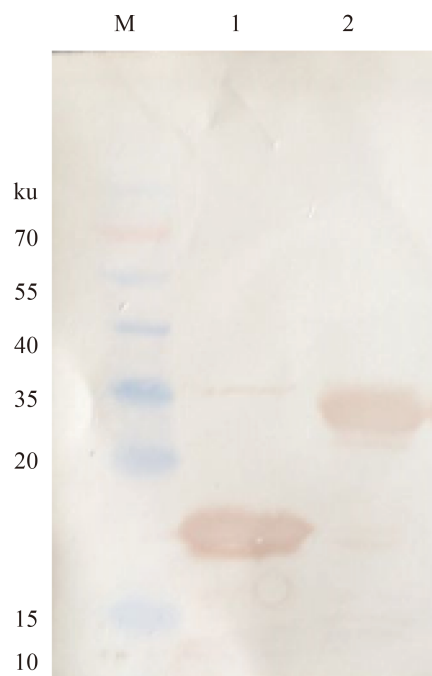


图6 半滑舌鳎重组MCH1蛋白的western blotting检测

1. 32 °C条件下0.2 mmol/L的IPTG诱导6 h的对照菌(空载pET-32a质粒); 2. 32 °C条件下0.2 mmol/L的IPTG诱导6 h的重组MCH1表达菌

Fig. 6 Western-blotting analysis of *C. semilaevis* recombinant MCH1 protein

1. control at 32 °C post 6 hours of induction with 0.2 mmol/L IPTG, 2. recombinant MCH1 protein at 32 °C post 6 hours of induction with 0.2 mmol/L IPTG

的蛋白能被6×His抗体特异性识别,具有抗原活性,表明半滑舌鳎MCH1重组蛋白表达成功。

2.4 MCH1/pET32a重组蛋白的纯化

取32 °C下以0.2 mmol/L的IPTG诱导6 h的重组MCH1表达菌,经Ni²⁺-NTA亲和层析柱分离、纯化目的蛋白,得到的纯化MCH1重组蛋白相对分子质量约为29.9 ku(图7),与预期大小相符合。BCA测定蛋白浓度为600 μg/mL。

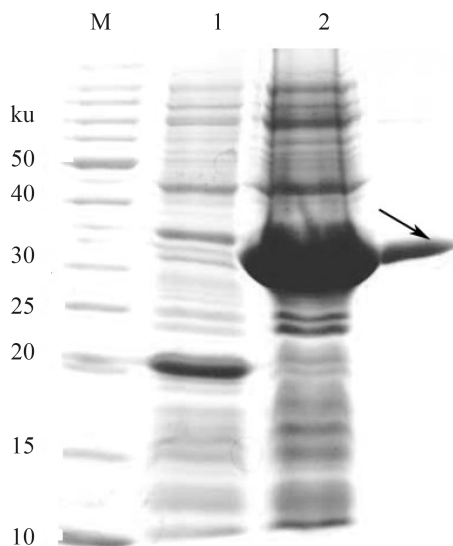


图7 半滑舌鳎重组MCH1蛋白的纯化

1.pET32a空载; 2.32 °C条件下0.2 mmol/L IPTG诱导6 h的重组MCH1蛋白表达菌; 3.Ni²⁺-NTA纯化柱纯化后蛋白液(箭头示29.9 ku重组蛋白)

Fig. 7 Purification of *C. semilaevis* recombinant MCH1 protein

1.pET32a; 2. recombinant MCH1 protein at 32 °C post 6 hours of induction with 0.2 mmol/L IPTG; 3. protein after Ni²⁺-NTA affinity chromatography column purification (the arrow indicates recombinant MCH1 protein)

2.5 重组蛋白的生物活性检测

激素水平表达变化 随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, 孵育液中MCH肽含量开始升高, 在100 nmol/L达到峰值($P<0.05$), 而在1000 nmol/L却显著降低($P<0.05$); MSH肽含量在100 nmol/L时开始显著增加($P<0.05$), 并在1000 nmol/L达到峰值($P<0.05$)(图8)。

基因表达变化 随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, 离体孵育垂体中MCH1 mRNA表达水平不断升高, 在10 nmol/L达到峰值($P<0.05$), 之后显著降低($P<0.05$)并逐渐达到与对照组同等

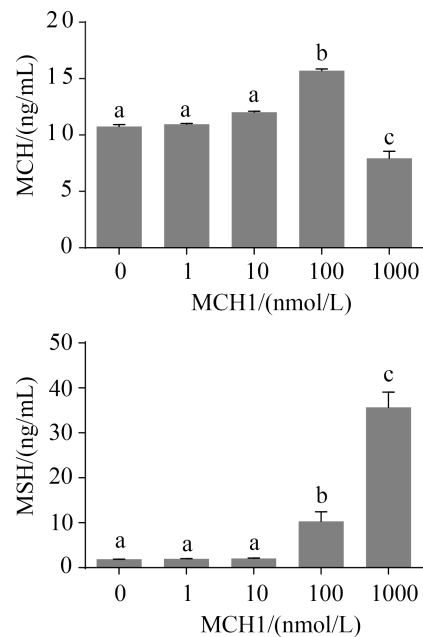


图8 垂体孵育液中MCH、MSH肽水平的变化
经单因素方差分析, 不同字母代表显著性差异($P<0.05$)

Fig. 8 MCH, MSH hormone levels in tissue culture medium

Bars with different letters differed with statistical significance at $P<0.05$, calculated by One-Way ANOVA

水平($P>0.05$); MCH2 mRNA表达水平在100 nmol/L时显著升高达到峰值($P<0.05$), 而其他浓度条件下MCH2表达与对照组基本一致。

随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, POMC-a mRNA表达水平呈现显著下降趋势($P<0.05$); 而POMC-b mRNA表达水平基本没有变化($P>0.05$)。外源MCH1重组蛋白对垂体MCHR1和MCHR2 mRNA表达水平也基本没有影响($P>0.05$)。垂体PACAP mRNA表达水平随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加显著下降($P<0.05$); MITF mRNA表达水平随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加基本没有变化($P>0.05$)(图9)。

3 讨论

本研究克隆了半滑舌鳎MCH1成熟肽片段, 首次实现了半滑舌鳎MCH1成熟肽在大肠杆菌中的原核表达, 并获得了纯化的MCH1重组蛋白, 并验证了该功能蛋白具有调节垂体激素分泌和基因表达的生理功能, 表明获得的MCH1重组蛋白具有生物活性, 为研制半滑舌鳎无眼侧黑化抑制调控的专用生物制剂提供了理论和技术依据。

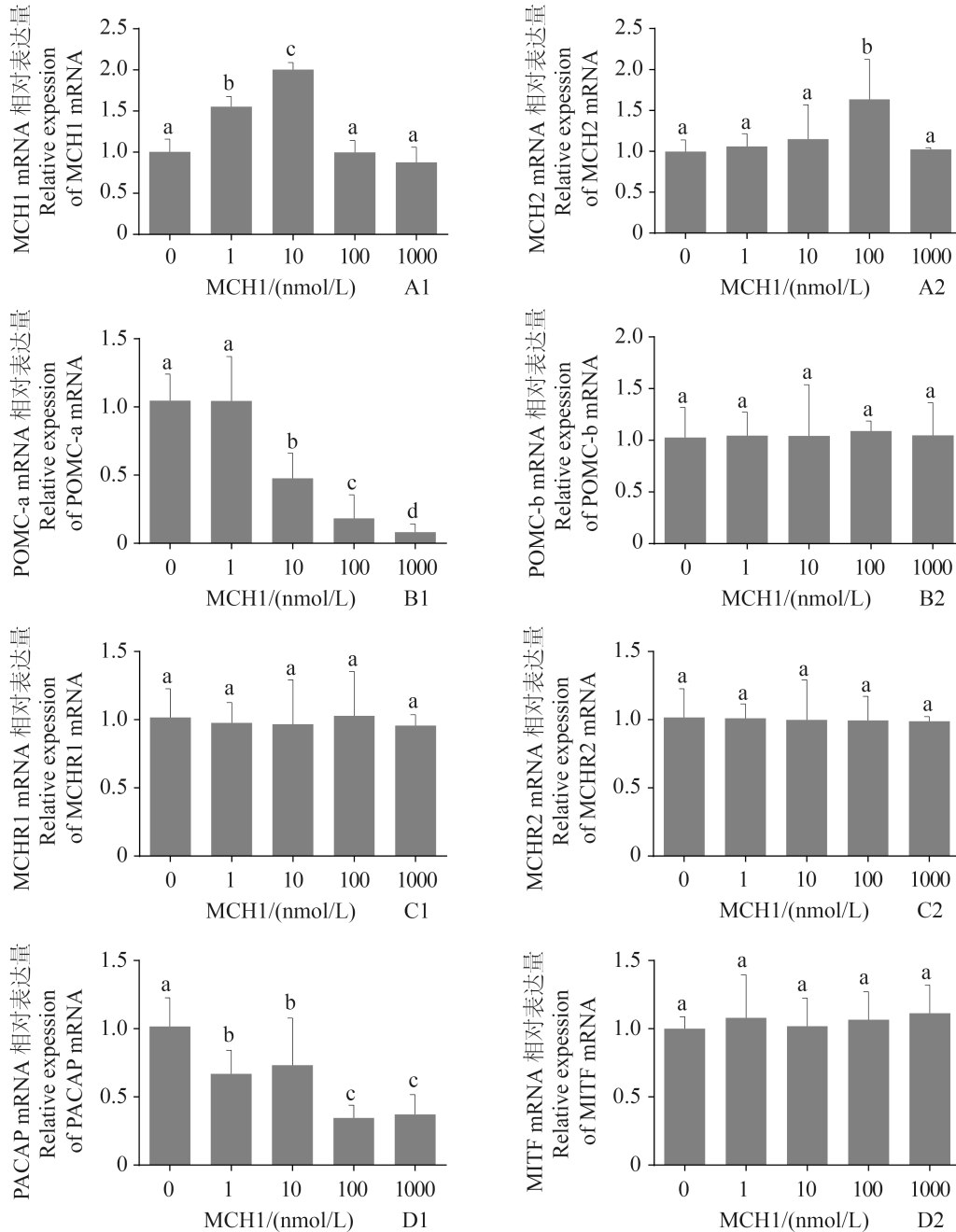


图 9 半滑舌鲷体色相关基因的相对表达量

MCH1(A1), MCH2(A2), POMC-a(B1), POMC-b(B2), MCHR1(C1), MCHR2(C2), PACAP(D1), MITF(D2)mRNA表达水平变化.经单因素方差分析, 不同字母代表显著性差异(P<0.05).

Fig. 9 The relative expression levels of genes related with blind-side hypermelanosis in *C. semilaievis*

The relative expression levels of MCH1(A1), MCH2(A2), POMC-a(B1), POMC-b(B2), MCHR1(C1), MCHR2(C2), PACAP(D1), MITF(D2), bars with different letters differed with statistical significance at P<0.05, calculated by One-Way ANOVA

3.1 表达载体选择和MCH1原核表达

本研究选用带有His标签的pET-32a载体作为重组表达载体, 对重组蛋白的Ni2+-NTA亲和层析和western blotting验证有利, 并且已证实重组蛋白添加的组氨酸末端不会影响目标蛋白生物

活性[13-14]。此外, PET载体是目前大肠杆菌表达重组蛋白的强大系统, 其自身表达水平较低, 利于实现目的蛋白的高效表达。我们利用pET-32a构建了重组质粒, 并确定在最佳条件下重组蛋白MCH1得到最大化的表达。原核表达系统中

目的蛋白的表达量主要受到诱导温度、诱导时间和诱导剂浓度等因素的影响^[15], 本研究中最适宜温度(32 °C)与之前以pET-32a为载体的原核表达相一致^[16-17], 最适宜的IPTG浓度(0.2 mmol/L)也处于普遍报道使用的0.1~1.0 mmol/L浓度范围内; 蛋白表达量在6 h达到最高, 增加诱导时间导致表达量降低, 这可能因为宿主菌蛋白酶量随着诱导时间延长而增加, 从而导致表达蛋白产生降解作用^[18]。

3.2 MCH1重组蛋白对垂体MCH和MSH肽分泌的影响

对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、星斑川鲷和条斑星鲷的研究都表明, MCH具有抑制无眼侧黑化发生和发育进程的调控作用^[3, 19-20], 而MSH具有刺激黑色素合成的功能^[21], MCH和MSH是一对具有拮抗生理功能的垂体神经肽。本研究发现, 随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, 垂体孵育液中MCH肽含量不断升高, 在100 nmol/L达到峰值, 而在1000 nmol/L却显著降低, 表明外源MCH1重组蛋白可在一定范围内促进垂体MCH肽的分泌, 但高浓度条件下则会抑制MCH肽的分泌。同时, 随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, 孵育液中MSH肽水平在100 nmol/L时开始显著增加, 并在1000 nmol/L大幅度升高, 表明外源蛋白达到一定含量时会显著促进垂体MSH肽的分泌。本研究还发现, 在MCH肽水平下降的同时MSH肽水平上升, 验证了MCH与MSH的拮抗作用, 同时也说明垂体MCH和MSH分泌细胞可能对外源MCH1重组蛋白存在不同的应答途径, 亟待在未来研究中加强在分泌细胞水平解析其可能的机制。

3.3 MCH1重组蛋白对体色相关基因表达的影响

对星斑川鲷的研究证实, MCH1、MCH2均参与了无眼侧黑化的调控过程^[3]。另有研究报道, 在明亮环境中, 条斑星鲷脑中MCH1和MCH2 mRNA表达水平明显增加, 表明MCH1和MCH2都参与了无眼侧黑化抑制的调控过程^[5, 22]。本研究中, 添加外源半滑舌鲷MCH1重组蛋白后, 孵育垂体中MCH1和MCH2 mRNA表达水平都呈现出先上升后下降的趋势, 不同的是MCH1在10 nmol/L达到峰值, 而MCH2在100 nmol/L达到峰值, 表明MCH1和MCH2都对外源MCH1重组蛋白产生了

应答, 但MCH2的应答时间晚于MCH1, 它们之间可能存在级联应答调控关系, 具体机制有待于深入研究证实。

已有研究证明, POMC参与了诱发养殖牙鲷无眼侧黑化发生的过程^[23]。同时, 对条斑星鲷的研究也发现POMC及其衍生多肽MSH都参与色素细胞的调节过程以及环境诱发无眼侧黑化的过程调节, 表明其与无眼侧黑化有直接联系^[24]。本研究中随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加, POMC-*a* mRNA表达水平呈现显著下降趋势, 表明了外源MCH1重组蛋白对垂体POMC-*a* mRNA表达水平有明显的抑制作用。POMC-*b* mRNA表达水平基本没有变化, 表明了可能POMC-*a*在半滑舌鲷无眼侧黑化调控机制上起主要作用。

研究表明, MCH通过其受体-MCHR作用调控黑色素颗粒的聚合^[25]。研究还发现, 在白色养殖环境下, 条斑星鲷有眼侧皮肤的MCHR2 mRNA表达量低于黑色养殖环境, MCHR1 mRNA却没有变化, 表明了MCHR2可能主要参与了体色对环境的适应调节^[19]。本研究中发现外源重组蛋白MCH1对MCHR1和MCHR2 mRNA表达水平基本没有影响, 说明MCH重组蛋白可能对内源性MCH mRNA调控可能存在多种信号途径, 值得今后深入探讨。

PACAP通过调节垂体激素的分泌参与皮肤黑色素细胞活动。对两栖动物的研究表明, PACAP是一个调节脊椎动物皮肤颜色的关键因子^[26], 直接作用于皮肤, 引起黑色素细胞中黑色素颗粒的分散^[27]。近期对罗非鱼的研究表明, PACAP具有使离体培养的黑色素细胞中黑色素颗粒聚集的作用^[28], 从而表现出黑化抑制作用。本研究发现, 垂体PACAP mRNA表达随着外源MCH1重组蛋白浓度的增加而显著下降, 表明外源MCH1重组蛋白在垂体层面对PACAP表达有一定的抑制调控作用, 但PACAP是否与MCH具有相同的功能, 尚有待于今后深入研究。MITF可调控酪氨酸基因家族的表达, 从而参与黑色素生成的调控^[29]。本研究中外源MCH1重组蛋白对MITF mRNA表达水平基本没有影响, 表明内源性MITF对MCH1重组蛋白应答较弱, 其可能通过非MCH/MCHR信号途径参与体色调控过程。

参考文献:

- [1] Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, et al.

- Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries[J]. *Nature*, 1983, 305(5932): 321-323.
- [2] Takahashi A, Itoh T, Nakanishi A, *et al.* Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA in the ratfish, a holocephalan[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 135(1): 159-165.
- [3] Kang D Y, Kim H C. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 189: 74-83.
- [4] Amiya N, Amano M, Takahashi A, *et al.* Effects of tank color on melanin-concentrating hormone levels in the brain, pituitary gland, and plasma of the barfin flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143(3): 251-256.
- [5] Mizusawa K, Kawashima Y, Sunuma T, *et al.* Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin flounder *Verasper moseri*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 214: 140-148.
- [6] 姜言伟, 万瑞景. 渤海半滑舌鳎的生殖习性及其产卵生态的研究[J]. *海洋水产研究*, 1988(9): 151-171.
- Jiang Y W, Wan R J. Reproductive behavior and Spawning ecology of *Cynoglossus semilaevis* Günther in the Bohai Sea[J]. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 151-171(in Chinese).
- [7] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布[J]. *海洋水产研究*, 1988(9): 11-89.
- Deng J Y, Meng T X, Ren S M, *et al.* Species composition, abundance and distribution of Fishes in the Bohai Sea[J]. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 11-89(in Chinese).
- [8] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民. 渤海鱼类的食物关系[J]. *海洋水产研究*, 1988(9): 151-172.
- Deng J Y, Meng T X, Ren S M. Food web of fishes in the Bohai Sea[J]. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 151-172(in Chinese).
- [9] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17-24.
- Liu X Z, Zhuang Z M, Ma A J, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17-24(in Chinese).
- [10] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 7-14.
- Liu X Z, Zhuang Z M, Ma A J, *et al.* Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(5): 7-14(in Chinese).
- [11] 史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体表色素细胞观察及POMC表达特性分析[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45-54.
- Shi X Y, Xu Y J, Wu N N, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45-54(in Chinese).
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Tian X C, Chen M J, Pantschenko A G, *et al.* Recombinant E-peptides of pro-IGF-I have mitogenic activity[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(7): 3387-3390.
- [14] 杨辉, 张英起, 颜真, 等. 人血管形成素在大肠杆菌中的融合表达、纯化及活性测定[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 55-58.
- Yang H, Zhang Y Q, Yan Z, *et al.* Human angiogenin: Expression, purification, biological assay[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(1): 55-58(in Chinese).
- [15] 叶星, 白俊杰, 劳海华, 等. 草鱼胰岛素样生长因子-1的融合表达、纯化和抗血清制备[J]. *水产学报*, 2002, 26(2): 122-126.
- Ye X, Bai J J, Lao H H, *et al.* Fusion expression and purification of *Ctenopharyngodon idellus* IGF-I and preparation of the antiserum against GST-IGF[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 122-126(in Chinese).
- [16] Studier F W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(1): 207-234.
- [17] 刘祥. 溶藻弧菌附着定植因子ACFA原核载体构建、表达条件优化及多克隆抗体制备[J]. *华北农学报*, 2015, 30(1): 35-41.
- Liu X. Construction prokaryotic vector, optimization expression conditions and polyclonal antibody

- preparation of *Vibrio alginolyticus* accessory colonization factor ACFA[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2015, 30(1): 35-41(in Chinese).
- [18] 刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鳎类胰岛素生长因子-I的原核表达及活性分析[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 706-712.
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* Güther[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 706-712(in Chinese).
- [19] Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y, *et al.* The melanin-concentrating hormone receptor 2(MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(2): 210-219.
- [20] Yamanome T, Amano M, Amiya N, *et al.* Hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is diminished by rearing in a white tank[J]. *Fisheries Science*, 2007, 73(2): 466-468.
- [21] Fredriksson R, Lagerström M C, Lundin L G, *et al.* The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints[J]. *Molecular Pharmacology*, 2003, 63(6): 1256-1272.
- [22] Yamanome T, Amano M, Takahashi A. White background reduces the occurrence of staining, activates melanin-concentrating hormone and promotes somatic growth in barfin flounder[J]. *Aquaculture*, 2005, 244(1-4): 323-329.
- [23] Kang D Y, Kim H C. Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 14-21.
- [24] Kobayashi Y, Mizusawa K, Yamanome T, *et al.* Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder, *Verasper moseri*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 419-424.
- [25] Kitahara N, Nishizawa T, Iida K, *et al.* Absence of a γ -melanocyte-stimulating hormone sequence in proopiomelanocortin mRNA of chum salmon *Oncorhynchus keta*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry*, 1988, 91(2): 365-370.
- [26] Kidane A H, Roubos E W, Jenks B G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates brain-derived neurotrophic factor exon IV expression through the VPAC1 receptor in the amphibian melanotrope cell[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(8): 4177-4182.
- [27] Marotti Jr L A, Jayawickreme C K, Lerner M R. Functional characterization of a receptor for vasoactive-intestinal-peptide-related peptides in cultured dermal melanophores from *Xenopus laevis*[J]. *Pigment Cell Research*, 1999, 12(2): 89-97.
- [28] Cardoso J C R, Félix R C, Martins R S T, *et al.* PACAP system evolution and its role in melanophore function in teleost fish skin[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 411: 130-145.
- [29] Takeda K, Yasumoto K I, Takada R, *et al.* Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(19): 14013-14016.

In vitro* expression and bioactivity analysis of melanin concentration hormone from *Cynoglossus semilaevis

ZHU Xuewu^{1,2}, XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou^{1,2*}, SHI Bao¹, WANG Bin¹, LI Bin^{1,2}

(1. 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)

Abstract: The mature peptide domain of melanin concentration hormone1 (MCH1) from *Cynoglossus semilaevis* Günther was amplified with specific primers based on their cDNA sequences from NCBI. Then the matured peptide fragments were subcloned into the prokaryotic expression vector pET-32a to successfully construct MCH1/pET-32a recombinant plasmid. The obtained recombinant MCH1 protein expressed in form of inclusion bodies with molecular weight of 29.9 ku and maximally accounted for 50% of the whole bacterial protein post 6-hour induction with 0.2 mmol/L IPTG at 32 °C. Western blotting analysis indicated that the obtained recombinant MCH1 protein had the antigenicity to His 6 antibody. The obtained target MCH1 protein was purified using Ni²⁺-NTA affinity chromatography method. The bioactivity of obtained target MCH1 protein was tested by the method of *in vitro* incubation of pituitary gland. The results showed that MCH1 recombinant protein can effectively stimulate or inhibit the secretion of pituitary MCH and MSH peptides. Wherein, the MCH peptide level increased with the MCH1 protein concentration and peaked at 100 nmol/L, however, it dramatically decreased at 1000nmol/L; the MSH peptide level showed a significant rise at 100nmol/L group, and peaked at 1000nmol/L of MCH1 protein. As for gene expression patterns, the *MCH1* and *MCH2* mRNAs levels showed similar variation trend, wherein *MCH1* mRNA showed upregulated expression with the recombinant MCH1 protein increasing, and peaked at 10 nmol/L group, and *MCH2* mRNA levels peaked at 100 nmol/L group. The pituitary *PACAP* and *POMC-a* mRNAs both exhibited down-regulated expression trends, and *POMC-b*, *MCHR1*, *MCHR2*, *MITF* mRNAs expression levels were not significantly affected by exogenous recombinant MCH1. In summary, the recombinant MCH1 protein could adjust the physiological functions of pituitary hormone secretion and gene expression. The present results could provide basic knowledge and technical support for development of high-efficient and specific additives which could be applied to aquaculture of *C. semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; melanin concentration hormone; prokaryotic expression; bioactivity

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

Funding projects: China Agriculture Research System(CARS-50)