

半滑舌鳎食欲素A体外重组表达及活性分析

李斌^{1,2}, 徐永江¹, 柳学周^{1,2*}, 史宝¹, 王滨¹, 朱学武^{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: 为了在蛋白水平上认识半滑舌鳎食欲素A (orexin A)的摄食调控作用及机制, 利用原核表达载体pET32a成功构建了重组半滑舌鳎orexin A/pET32a质粒, 转化至大肠杆菌BL21后经IPTG诱导获得了N端含6个组氨酸的半滑舌鳎orexin A重组蛋白。获得的重组蛋白大小为24.9 ku, 32 °C下用1.0 mmol/L的IPTG诱导6 h目的蛋白表达量最高, 占菌体总蛋白的52.8%, 并主要分泌在上清液中。Western blotting免疫印迹表明, 获得的orexin A重组蛋白可被6×His抗体特异性识别。Ni²⁺-NTA亲和层析柱纯化获得了高纯度的半滑舌鳎orexin A重组蛋白。下丘脑离体孵育实验表明, 获得的orexin A重组蛋白能显著影响半滑舌鳎下丘脑NPY mRNA, orexin mRNA的表达水平和NPY肽的分泌, 表明获得的重组蛋白具有生物活性。研究结果可为探究orexin A在半滑舌鳎摄食代谢中的作用机制及研制高效绿色的促摄食制剂提供基础资料。

关键词: 半滑舌鳎; 食欲素; 原核表达; 生物活性

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

orexin通称为食欲素, 又称作食欲肽(hypocretin), 是近年来发现的一组新型下丘脑神经肽, 最初是在大鼠下丘脑腹外侧核内发现的, 包括orexin A和orexin B (OXA、OXB)^[1]。orexin主要由下丘脑神经元产生, 通过其神经纤维的直接投射或释放入脑脊髓液作用于靶位点, 激活2种与G蛋白耦联的细胞表面受体OX₁R和OX₂R, 参与调节机体摄食、能量代谢、睡眠觉醒、循环等生理活动^[2]。

目前, 关于orexin的研究多集中于哺乳动物。已有结果表明, 人、牛、猪、啮齿类的orexin A完全一样, 均为含有2个二硫键的33肽。大鼠与小鼠的orexin B完全一样, 均由28个氨基酸组成, 人与啮齿类仅有2个氨基酸的差异, 与猪仅有1个氨基酸的差异。鸡的orexin A和orexin B与哺乳动物分别有85%和65%的同源性。orexin A与orexin B在系统进化发育中的高度同源性, 揭示

了orexin在动物生命演化过程中有着重要的功能^[3-5]。有关鱼类orexin的生理作用研究起步较晚, 目前已开展了金鱼(*Carassius auratus*)^[6]、大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[7]和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[8]等的相关研究。将已研究鱼类的orexin基因序列与人类进行比对后发现, 在食欲素C末端和间隔区域的氨基酸序列具有较高的同源性, 且这些氨基酸在受体结合中以及生物活性中的作用不可或缺。因此, 也说明食欲肽无论在鱼类还是哺乳动物中都具有相类似的功能^[9], 是一种新型的能够调节动物机体摄食和能量代谢的下丘脑神经多肽物质^[10]。随着垂体促性腺激素释放激素(GnRH)、生长激素(GH)等神经多肽在养殖生产中成熟地应用于鱼类的生长和繁殖调控^[11-13]。今后, 利用orexin及其相关产物来调控人工养殖鱼类的摄食、营养代谢、能量平衡及其他生理活动将成为重点研究的方向之一。

收稿日期: 2015-11-27 修回日期: 2016-06-03

资助项目: 国家鲆鲽类产业技术体系专项(CARS-50); 国家国际科技合作专项(2013DFA31410)

通信作者: 柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水增殖经济鱼种。自2003年半滑舌鳎人工繁育技术突破以来^[14-15], 其养殖业迅速发展并已成为我国鲆鲽类三大主导养殖种类之一。目前, 对养殖半滑舌鳎摄食相关因子的研究尚未开展, 不利于对其摄食与生长机制的深入认识, 因此市场上一直缺乏高效的半滑舌鳎养殖专用、绿色促摄食制剂。本实验开展了半滑舌鳎orexin A原核表达及生物活性分析, 获得了具有生物活性的半滑舌鳎orexin A体外重组蛋白, 以期为开发半滑舌鳎摄食与生长调控技术提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用鱼取自海阳市黄海水产有限公司, 3尾半滑舌鳎[全长(42.33±5.3) cm, 体质量(1415.85±36.8) g], 用MS-222(300 mg/L)麻醉处死后迅速取脑置于液氮(-196 °C)保存, 用于总RNA提取。

实验用30尾半滑舌鳎成鱼[全长为(35±6.3) cm, 体质量为(750±30.8) g], 用MS-222麻醉致死快速摘取下丘脑, 置于L15液体培养基中孵育, 用于蛋白活性测试分析。

1.2 orexin A成熟肽的克隆

利用TRIzol法提取脑总RNA, 反转录合成第一链cDNA。根据半滑舌鳎orexin基因预测序列(GenBank获取号: XM_008330040.1), 经与其他鱼类orexin基因进行比对, 设计特异性引物P1和P2扩增其成熟肽序列。在P1和P2的5'端分别添加EcoR I和Xho I酶切位点(方框标注), 在P2中添加了终止密码子TAA(下划线标注)。

P1: 5'-CG[GAATTC]AACAGTATGACCGAGTGC-3'

P2: 5'-[CTCGAG]TTACAGAGTGAGGATCCCA-3'

PCR条件为94 °C 5 min变性, 35个循环(94 °C 30 s、67 °C 30 s、72 °C 50 s), 72 °C延伸10 min。将目的片段切胶回收后连接到pEASY-T1 Simple载体上, 挑选阳性克隆测序验证。

1.3 重组质粒的构建

抽提重组的orexin A克隆质粒和表达载体pET-32a, 分别用EcoR I和Xho I (Thermo)双酶

切, 切胶回收, 以T4连接酶连接得到表达重组质粒orexin A/pET32a, 转化至大肠杆菌Trans-T1感受态细胞(TransGen)中, 菌液培养后PCR验证并测序。

1.4 重组质粒在表达菌株中的表达

测序正确的表达重组质粒转化到表达菌株BL21(TransGen)中, 在液体LB培养基中(含氨苄霉素)培养至OD₆₀₀值达0.6~0.7(37 °C), 添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG, 1 mmol/L)继续培养。

在添加IPTG诱导0、1、2、3、4、5、6、7和8 h时分别吸取2 mL表达菌液, 离心收集菌体(8000 r/min 10 min, 4 °C)以PBS洗涤并重悬, 以SDS-PAGE电泳(15%分离胶)和SigmaScan pro 5软件分析目的蛋白的表达效率。

将菌液分别在22、27、32、37和42 °C条件下以IPTG (1 mmol/L)诱导6 h, 研究不同温度下重组蛋白表达量的差异。

菌液在37 °C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0.1、0.25、0.5、0.75、1.0和2.0 mmol/L诱导, 6 h, 研究不同IPTG浓度对重组蛋白表达的诱导作用。

1.5 重组蛋白的Western blotting验证

收集以IPTG (1 mmol/L)诱导6 h的表达菌体, 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6×His单抗(TransGen)为一抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG(TransGen)为二抗, 室温下分别孵育1 h, 利用HRP-DAB试剂盒(Solarbio)显色, 观察拍照。

1.6 重组蛋白的纯化和复性

取32 °C条件下IPTG (1 mmol/L)诱导表达6 h的重组菌, 离心(8000 r/min 10 min, 4 °C), 收集沉淀并以PBS洗涤, 用1/10体积的超声波破碎液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、0.5 mol/L NaCl、1 mmol/L EDTA)重悬菌体, 重悬后的菌液于冰浴中进行超声破碎, SDS-PAGE检测沉淀和上清。取上清, 先后用0.45和0.22 μm微孔滤膜过滤, 用Ni²⁺-NTA亲和层析柱(GE)分离纯化融合蛋白, 利用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo)检测得到的纯化重组蛋白浓度, 再以0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后置于-80 °C超低温冰箱保存备用。

1.7 orexin A重组蛋白生物活性检测

下丘脑离体孵育 利用L15液体培养基清洗下丘脑组织,后于10%小牛血清的L15培养液中培养6 h,置于CO₂培养箱(Heal Force, 香港)中培养,培养温度25 °C。之后,将下丘脑组织转移至含有不同浓度orexin A重组蛋白(0、1、10、100和1000 nmol/L)无小牛血清的L15培养液,每个浓度组设置2个重复,继续在CO₂培养箱中25 °C培养24 h。培养结束后,分别收集孵育液和下丘脑组织用于NPY肽测定和NPY、orexin mRNA的表达检测。

NPY表达水平测定 NPY肽表达水平用NPY (Mouse)-Elisa试剂盒(北京康肽)检测(半滑舌鳎orexin A与小鼠orexin A相似性达91.0%)。严格按照试剂盒说明书方法制作标准曲线且得到样品线性相关系数R值为0.99,符合相关系数R大于0.92。每一组织样品的分析进行3次平行试验,每次实验3个重复,将测得的OD值代入标准曲线,计算得到样品中NPY肽的浓度。

qPCR检测NPY和orexin mRNA表达变化 离体孵育下丘脑组织提取总RNA检测NPY和orexin mRNA的表达水平变化。根据本实验室克隆得到的半滑舌鳎orexin序列和从NCBI获得的半滑舌鳎的NPY(GenBank序列号:XM_008331274)的cDNA序列分别设计两对定量引物,以18S为内参设计定量引物18S-F和18S-R,定量PCR引物序列见表1。

表1 半滑舌鳎实时定量用引物序列

Tab. 1 Primers sequences used for qPCR

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequences	备注 remarks
orexin A-F	AGGACTGCAAGGATGGACAC	orexin A Real-time PCR
orexin A-R	AGCACTCGGTCATACTGTTGG	
NPY-F	CCACAGACACACTCCACAATC	NPY Real-time PCR
NPY-R	GGCGACAGAGGATACAGGAG	
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	18S Real-time PCR
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	

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

ExTaqTM II 10 μL和ddH₂O 6.4 μL,采用两步法,orexin A的PCR反应条件:95 °C预变性30 s,95 °C 5 s,59 °C 20 s共40个循环;NPY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。

制作标准曲线并根据相关系数(r^2)和扩增效率(E)确定反应条件,理想的 r^2 接近于1,0.8< E <1.2,且相差不超过1%。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,每次实验均设置空白对照。以18S为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算目的基因的相对表达量^[6]。

1.8 数据分析

实验数据采用SPSS 17.0统计进行单因素方差分析(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 半滑舌鳎orexin A/pET32a表达载体构建

经与其他鱼类的orexin A成熟肽序列比对,鉴定出半滑舌鳎orexin A成熟肽序列。酶切检测表明,半滑舌鳎orexin A成熟肽序列成功连接到pET32a表达载体上得到重组表达载体orexin A/pET32a(图1和图2)。重组质粒将表达24.9 ku的融合蛋白,等电点为5.52,由232个氨基酸组成。将重组表达载体转化到BL21(TransGen),进行诱导表达。

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达

将重组质粒orexin A/PET32a转化入大肠杆菌BL21进行诱导表达,SDS-PAGE电泳显示,经IPTG诱导的重组菌在24.9 ku处出现特异性条带。不同诱导条件下的重组菌蛋白表达量各不相同,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orexin A表达的最优条件为32 °C、IPTG(0.5 mmol/L)诱导培养6 h,重组蛋白表达量占细菌总蛋白的52.8%(图3~图5)。

2.3 orexin A重组蛋白的Western blotting验证

采用Western blotting免疫印迹方法对32 °C下

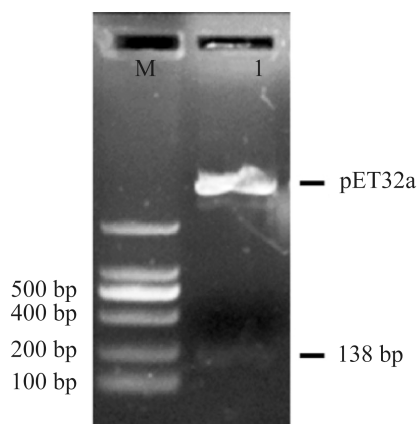


图1 半滑舌鳎orexin A/pET32a的EcoR I和Xho I双酶切检测结果

M: DNA Marker; 1: orexin A/pET32a质粒和双酶切产物

Fig. 1 Double digestion products identification of orexin A/pET32a recombinant plasmid

M: DNA Marker; 1. double digestion products of orexin A/pET32a recombinant plasmid with restriction enzymes *EcoR* I/*Xho* I

0.2 mmol/L的IPTG诱导6 h的orexin A重组菌分别进行检测, 结果显示, 在PVDF膜上出现24.9 ku的单一印迹(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, 表明半滑舌鳎orexin A重组蛋白表达成功。

2.4 orexin A重组蛋白的纯化

取32 °C下1 mmol/L IPTG诱导6 h的orexin A重组表达菌, Ni²⁺-NTA亲和层析柱分离出的蛋白液进行SDS-PAGE电泳检测, 结果显示通过Ni²⁺-NTA亲和层析柱可对重组蛋白进行有效的分离纯化, 纯化的orexin A重组蛋白相对分子质量为24.9 ku(图7), 与预期大小相符合。

2.5 重组蛋白的生物活性检测

ELISA检测结果表明, 随着外源orexin A重组蛋白浓度的增加, 离体的下丘脑孵育液中NPY肽的表达水平呈上升趋势, 并在1000 nmol/L时达到峰值($P<0.05$)(图8)。

qPCR检测结果显示, 随着orexin A重组蛋白浓度的增加, 下丘脑NPY mRNA的表达水平升高, 从100 nmol/L开始显著上升($P<0.05$), 在1000 nmol/L时达峰值(为对照组10倍以上) ($P<0.05$)(图9和图10)。

随着orexin A重组蛋白浓度的增加, 下丘脑orexin mRNA表达水平显著下降 ($P<0.05$), 当orexin A蛋白的浓度达到10 nmol/L时下降到最小值($P<0.05$), 自100 nmol/L时orexin mRNA的表达水平又上升到与对照组同等的水平($P>0.05$)。

```

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
                                     H H H H H H
GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC 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 GAA TTC AAC AGT ATG ACC GAG TGC TGC AGA CAA ACA TCT CGC TCC
                EcoR I N S M T E C C R Q T S R S
TGC CGC CTC TAC ATC CTG CTG TGC CGC TCA GGC GGA AGC TTC GTG AGC GGA GCC
C R L Y I L L C R S G G S F V S G A

CTG ACA GGC GAC GCC GCC GCT GGG ATC CTC ACT CTG TAA CTC GAG
L T G D A A A G I L T L * Xho I
  
```

图2 半滑舌鳎orexin A成熟肽重组序列

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EcoR I、Xho I; 单下划线部分为半滑舌鳎orexin A成熟肽

Fig. 2 The matured peptide sequence of orexin A 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 *EcoR* I and *Xho* I are boxed and the mature peptide is single underlined

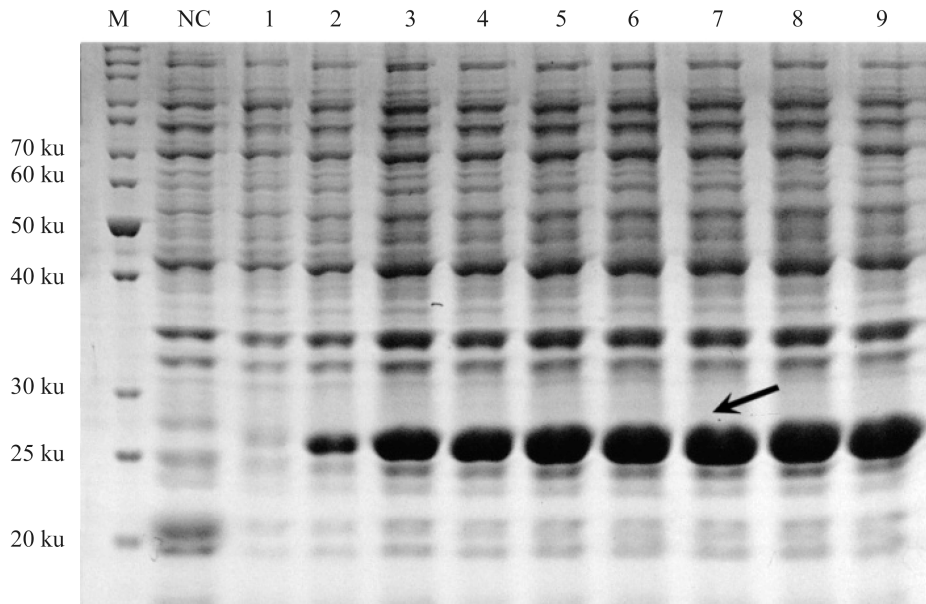


图3 诱导时间对半滑舌鲷orexin A重组蛋白表达的影响

M: 蛋白Marker; NC: 37 °C条件下1.0 mmol/L的IPTG诱导6 h的对照菌(空载pET-32a质粒); 1~9: 37 °C条件下1.0 mmol/L的IPTG诱导0、1、2、3、4、5、6、7和8 h的orexin A重组蛋白(箭头所指重组蛋白)

Fig. 3 Effects of induction time on production of *C. semilaevis* recombinant orexin A protein

M. protein weight marker, NC: control at 37 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 1~9. recombinant orexin A at 37 °C post 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG (the arrow indicates recombinant orexin A protein)

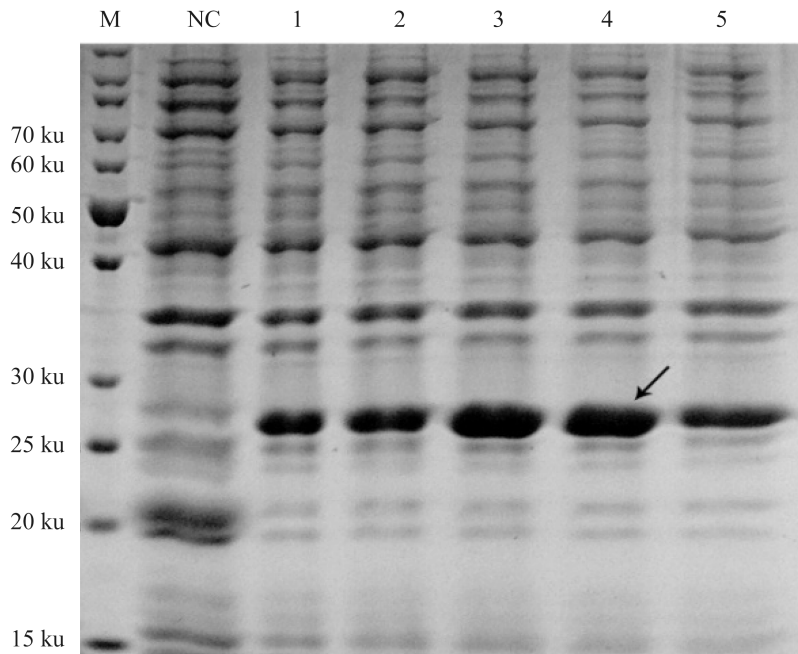


图4 温度对半滑舌鲷orexin A重组蛋白表达的影响

M: 蛋白Marker; NC: 诱导6h的对照菌(空载质粒); 1~5: 22、27、32、37和42 °C诱导6 h(IPTG浓度为1.0 mmol/L)的orexin A重组蛋白(箭头示重组蛋白)

Fig. 4 Effects of temperature on production of *C. semilaevis* recombinant orexin A protein

M. protein weight marker, NC: control at 37 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 1~5. recombinant orexin A protein expression at 22, 27, 32, 37 and 42 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG (the arrow indicates recombinant orexin A protein)

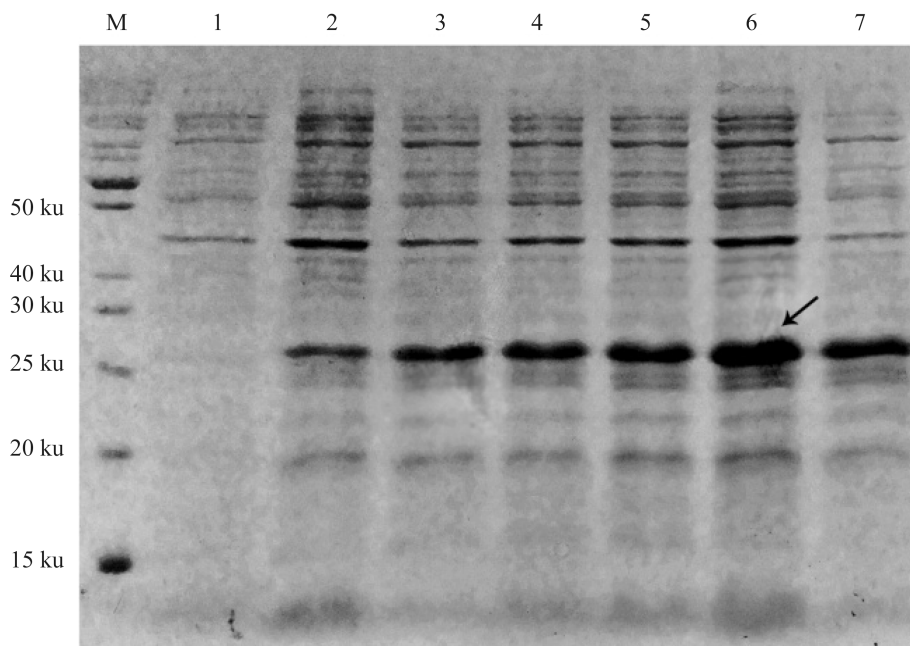


图 5 IPTG浓度对半滑舌鳎orexin A重组蛋白表达的影响

M: 蛋白Marker; 1~7: 32 °C条件下0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、2.0 mmol/L的IPTG诱导6 h的orexin A重组蛋白(箭头示重组蛋白)

Fig. 5 Effects of IPTG concentrations on production of *C. semilaervis* recombinant orexin A protein

M: protein weight marker, 1~7: recombinant orexin A protein at 32 °C post 6 hours of induction with 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mmol/L IPTG (the arrow indicates recombinant orexin A protein)

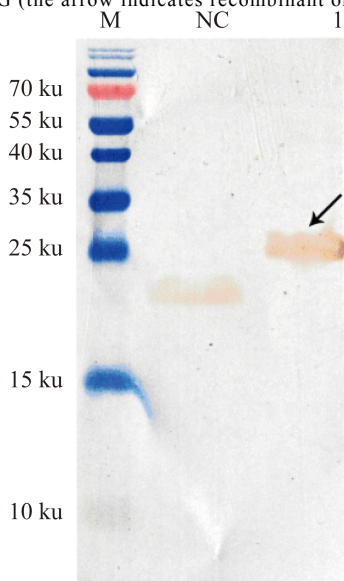


图 6 半滑舌鳎orexin A重组蛋白的Western blotting检测

M: 蛋白Marker; NC: 32 °C条件下1 mmol/L的IPTG诱导6 h的对照菌(空载pET-32a质粒); 1: 32 °C条件下1 mmol/L的IPTG诱导6 h的重组orexin A表达菌(箭头示重组蛋白)

Fig. 6 Western blotting analysis of *C. semilaervis* recombinant orexin A protein

M: Marker, NC: control at 32 °C post 6 hours of induction with 1 mmol/L IPTG, 1: recombinant orexin A protein at 32 °C post 6 hours of induction with 1 mmol/L IPT (the arrow indicates recombinant orexin A protein)

3 讨论

本实验首次实现了半滑舌鳎orexin A成熟肽的体外原核重组表达, 并纯化获得了具有生物活性的orexin A重组蛋白。已有研究证实, orexin A对于鱼类的摄食调控具有明显作用, 并且可能对生长也具有一定调控作用^[11], 因此, orexin A重组蛋白的获得对于半滑舌鳎摄食和生长调控机制与技术研究具有重要意义。

选用带有His标签的pET32a载体作为半滑舌鳎orexin A的重组表达载体, 可大大方便重组蛋白的Ni²⁺-NTA亲和层析纯化和Western blotting验证, 并且已有报道证实重组蛋白添加的组氨酸末端不会对目标蛋白生物活性产生影响^[17-18]。此外, pET载体被认为是目前大肠杆菌表达重组蛋白的强大系统, 其基础表达水平较低, 利于实现目的蛋白的高效表达。本实验利用大肠杆菌原核表达载体pET-32a来构建重组质粒, 经IPTG诱导条件的筛选, 不同温度时间诱导结果显示, 32 °C诱导温度最合适, 1 mmol/L IPTG诱导6 h表达量最大。原核表达系统中目的蛋白的表达量受到重组蛋白分子量、重组菌浓度、诱导温度、诱导时间和诱导剂浓度等因素的影响^[18],

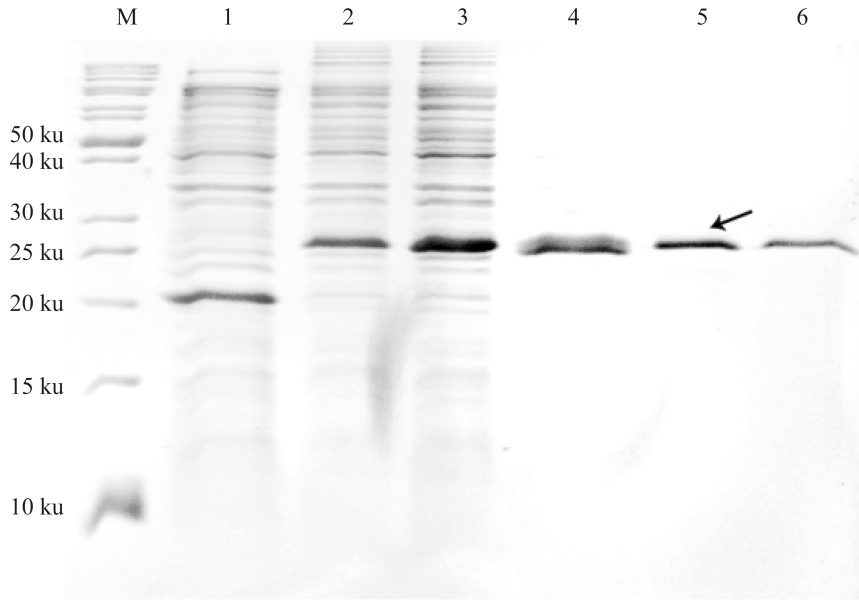


图7 半滑舌鲷orexin A重组蛋白的纯化

M: 蛋白Marker; 1: pET32a空载; 2: orexin A重组蛋白超声波破碎后沉淀; 3: orexin A重组蛋白超声波破碎后上清液; 4~6: Ni²⁺离子纯化柱纯化后蛋白(箭头指向为orexin A重组蛋白)

Fig. 7 Purification of *C. semilaevis* recombinant orexin A protein

M: Marker, 1. control at 32 °C post 6 hours of induction with 1.0 mmol/L IPTG, 2. inclusion bodies after ultrasonic disruption; 3. supernatant after ultrasonic disruption; 4-6: protein after Ni²⁺ affinity chromatography column purification (the arrow indicates recombinant orexin A protein)

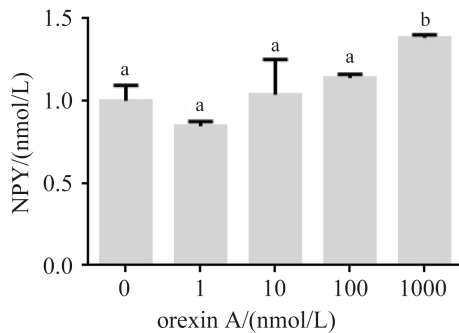


图8 下丘脑孵育液中NPY肽表达水平含量情况

不同字母表示差异显著(P<0.05), 下同

Fig. 8 NPY levels in hypothalamus culture medium

Different letters mean significant differences (P<0.05), the same below

最适宜的IPTG浓度(1 mmol/L)也处于普遍报道使用的0.1~1.0 mmol/L^[19]; 诱导6 h后蛋白表达量达到最高, 增加诱导时间(至8 h)并没有提高表达量, 这可能是因为宿主菌蛋白酶量随着诱导时间延长而增加导致表达蛋白产生降解作用^[9]。将大肠杆菌破碎后发现, 破碎上清液中orexin A重组蛋白含量高于包涵体中的含量, 可直接将上清液经过Ni²⁺-NTA亲和层析柱, 避免包涵体裂解破坏蛋白活性^[20]。因此, 本实验选择pET32a载体

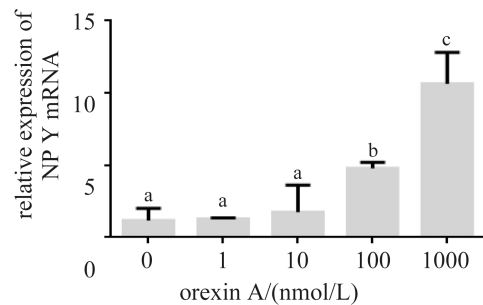


图9 半滑舌鲷orexin A重组蛋白对下丘脑NPY mRNA表达的影响

Fig. 9 Effects of *C. semilaevis* orexin A recombinant protein on hypothalamus NPY mRNA levels

和BL21表达菌株的表达系统来进行orexin A的体外重组表达, 节省了实验步骤, 可更为方便地获得orexin A重组蛋白。

近年来的研究发现, orexin是主要的摄食调控基因, 如斑马鱼(*Danio rerio*)经过长期饥饿后能够诱导下丘脑orexin mRNA水平的显著增加^[21]; 金鱼注射orexin后可明显促进摄食^[22]。对金鱼的研究还发现, orexin与包括NPY、生长激素释放肽(ghrelin)、CART肽(cocaine and amphetamine regulated transcript, 受可卡因和安非他明调节的

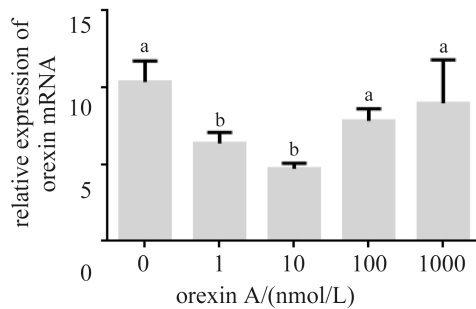


图 10 半滑舌鳎重组orexin A重组蛋白对下丘脑orexin mRNA表达的影响

Fig. 10 Effects of *C. semilaevis* orexin A recombinant protein on hypothalamus orexin mRNA levels

转录产物)和瘦素在内的其他摄食调控因子存在相互作用。如orexin A和NPY在调控途径上存在协同作用,同时,注射orexin A和NPY的实验组摄食量增加明显高于单独注射NPY组,并且注射orexin A后下丘脑NPY基因的表达也会相应增加^[21]。同时,对大鼠的研究发现,若在脑室内先于NPY注射orexin抗血清,将显著削弱NPY促进摄食的作用^[23]。本实验通过下丘脑离体孵育的方法测试了orexin A重组蛋白的生物活性,在孵育液中加入半滑舌鳎orexin A重组蛋白,结果发现orexin A重组蛋白对下丘脑orexin mRNA表达影响不大,当orexin A蛋白浓度为1~10 nmol/L时会抑制自身orexin mRNA的表达,但当orexin A蛋白浓度达100 nmol/L以上时,下丘脑orexin mRNA表达升高,表明高浓度的orexin A重组蛋白可诱导自身orexin基因的下调或上调表达。对于下丘脑NPY mRNA的表达,则随orexin A蛋白浓度的增加而显著升高,表明半滑舌鳎中orexin A重组蛋白可以促进NPY基因的显著上调表达。同时,结果也显示当orexin A重组蛋白浓度达到100 nmol/L后,外源orexin A重组蛋白引发了半滑舌鳎下丘脑NPY和orexin基因同步上调表达,表明其可有效促进摄食中枢系统关键调控因子的表达,其具体的调控信号途径有待于进一步确证。另外,激素测定结果也表明随着orexin A蛋白浓度的增加,孵育液中NPY肽的表达水平逐渐升高,并在1000 nmol/L时达到峰值,表明外源orexin A蛋白刺激了下丘脑分泌NPY肽的增加,但NPY肽水平的上升晚于基因上调表达,可能orexin A调控NPY基因与肽表达的信号通路存在差异^[22, 24],有待于今后研究。这些结果都证

明,本研究通过原核表达系统体外获得的半滑舌鳎orexin A重组表达蛋白具有明显的生物活性。

本实验利用原核表达系统获得了纯化的且具有生物活性的半滑舌鳎orexin A重组蛋白,验证了orexin A重组蛋白可有效调节内源性orexin基因、NPY基因与肽的表达。原核表达系统所生产的蛋白没有真核生物的结构修饰,功能上可能会有一定的缺陷。同时原核表达系统难以具有酵母表达系统的产能优势。因此,在本实验结果的基础上,开展orexin A的真核表达研究,从而大量获得制备体外制备的orexin A重组蛋白,可为研制应用于生产的绿色促摄食饲料添加剂提供理论支撑和技术支持。

参考文献:

- [1] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, *et al.* Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. *Cell*, 1998, 92(4): 573-585.
- [2] 何文波, 彭克美, 邱德新. 神经肽Orexins的研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2004, 23(6): 692-697.
He W B, Peng K M, Qiu D X. Advances of the research on orexins[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2004, 23(6): 692-697 (in Chinese).
- [3] De Lecea L, Kilduff T S, Peyron C, *et al.* The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(1): 322-327.
- [4] Hungs M, Fan J, Lin L, *et al.* Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines[J]. *Genome Research*, 2001, 11(4): 531-539.
- [5] 雷治海. 开胃素(orexin)的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2003, 35(8): 40-43.
Lei Z H. Overview of orexin research[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2003, 35(8): 40-43 (in Chinese).
- [6] Himick B A, Peter R E. Neuropeptide regulation of feeding and growth hormone secretion in fish[J]. *Netherlands Journal of Zoology*, 1994, 45(1): 3-9.
- [7] Xu M Y, Volkoff H. Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation[J]. *Molecular and Cellular*

- Endocrinology, 2007, 271(1-2): 28-37.
- [8] Yan A F, Zhang L G, Tang Z G, *et al.* Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) orexin: Molecular cloning, tissue expression, ontogeny, daily rhythm and regulation of NPY gene expression[J]. Peptides, 2011, 32(7): 1363-1370.
- [9] Alvarez C E, Sutcliffe J G. Hypocretin is an early member of the incretin gene family[J]. Neuroscience Letters, 2002, 324(3): 169-172.
- [10] 刘滨, 雷霖霖, 刘新富, 等. 鱼类下丘脑增食欲素 (Orexin)研究进展[J]. 渔业信息与战略, 2012, 27(4): 322-329.
- Liu B, Lei J L, Liu X F, *et al.* Advances in the study on Orexin of fish[J]. Fisheries Information & Strategy, 2012, 27(4): 322-329 (in Chinese).
- [11] Peng C, Peter R E. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish[J]. Zoological Studies, 1997, 36(2): 79-89.
- [12] Montero M, Yon L, Rousseau K, *et al.* Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla*[J]. Endocrinology, 1998, 139(10): 4300-4310.
- [13] Parker D B, Power M E, Swanson P, *et al.* Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release[J]. Endocrinology, 1997, 138(1): 414-423.
- [14] 柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 25-32.
- Liu X Z, Sun Z Z, Ma A J, *et al.* Study on the technology of Spawner culture and eggs collection of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 25-32 (in Chinese).
- [15] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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).
- [19] Amersham Pharmacia Biotech. GST Gene Fusion System [M]. 3rd ed. Atlanta: Pharmacia Biotech, Inc., 2001.
- [20] 杜敏, 朱美君, 张曼夫, 等. 钙蛋白酶抑制蛋白功能结构域IV在大肠杆菌中的表达、纯化及其抗血清的制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(1): 23-27.
- Du M, Zhu M J, Zhang M F, *et al.* Expression of functional domain IV of calpastatin in *E. coli* and preparation of antiserum against purified GST-Calpastatin[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 16(1): 23-27 (in Chinese).
- [21] Kaslin J, Nystedt J M, Östergård M, *et al.* The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems[J]. Journal of Neuroscience, 2004, 24(11): 2678-2689.
- [22] Volkoff H, Bjorklund J M, Peter R E. Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B[J]. Brain Research, 1999, 846(2): 204-209.
- [23] Niimi M, Sato M, Taminato T. Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin[J]. Endocrine, 2001, 14(2): 269-274.
- [24] Chen J Y, Chen J C, Chang C Y, *et al.* Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides[J]. Aquaculture, 2000, 181(3-4): 347-360.

Prokaryotic expression and bioactivity analysis of orexin A from *Cynoglossus semilaevis*

LI Bin^{1,2}, XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou^{1,2*}, SHI Bao¹, WANG Bin¹, ZHU Xuewu^{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: In order to investigate the underlying mechanisms for food intake regulation of *Cynoglossus semilaevis*, one of the key feeding factors-orexin A-was produced *in vitro* in prokaryotic expression system and its possible role in feed intake regulation was explored using *in vitro* incubation method of hypothalamus gland. The matured peptide fragment of orexin A was amplified and subcloned into the prokaryotic expression vector-pET32a to successfully construct orexin A/pET32a recombinant plasmid which was highly expressed in *E.coli* BL21 after being induced by IPTG with special fusion polypeptides containing His6 at their N-terminus. The orexin A fusion protein was mainly expressed in supernatant liquid with molecular weight of 24.9 kDa, and the fusion protein products maximally accounted for 52.8 % of the whole bacterial protein post 6h induction with 1 mmol/L IPTG at 32 °C. Western blotting analysis indicated fusion protein had the antigenicity to His6 antibody. Supernatant after crushing, was purified using Ni²⁺-NTA affinity chromatography, then the purified protein with molecular weight of 24.9 kDa was obtained. Incubating hypothalamus with recombinant expression orexin A of *Cynoglossus semilaevis* indicates that orexin A can significantly influence expression of *NPY* mRNA, *orexin A* mRNA and secretion of *NPY* peptide in hypothalamus. Therefore, the obtained recombinant orexin A protein has biological activity in the present study. The present results would be helpful for better understanding the roles of orexin A in feeding regulation and development of high-efficient feeding promotion additives for aquaculture of *Cynoglossus semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; orexin A recombinant protein; prokaryotic expression; bioactivity analysis

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

Funding projects: China Agricultural Research System (CARS-50); International S&T Cooperation Program of China (2014DFA31410)