

半滑舌鳎食欲素B的体外重组制备与生物活性分析

徐永江^{1,2}, 李斌^{1,2}, 柳学周^{1,2*}, 张凯³,
史宝^{1,2}, 王滨^{1,2}, 宋雪松^{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. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237;

3. 青岛贝宝海洋科技有限公司, 山东 青岛 266400)

摘要: 为了认识食欲素(orexin)编码的多肽orexin B对半滑舌鳎摄食的调控作用及机制, 利用原核表达载体pET-32a成功构建了重组半滑舌鳎orexin B/pET-32a质粒, 转化至大肠杆菌BL21后, 经IPTG诱导获得了N端含6个组氨酸分子标签的orexin B重组蛋白。重组蛋白大小为21.14 ku, 在温度37 °C条件下以1.0 mmol/L的IPTG诱导6 h的orexin B重组蛋白表达量最高, 占菌体总蛋白的43.5%, 并主要分泌于上清液中。Western blotting免疫印迹表明, 获得的orexin B重组蛋白可被6×His抗体特异性识别。Ni²⁺-NTA亲和层析柱纯化可获得高纯度的半滑舌鳎orexin B重组蛋白。离体孵育实验表明, orexin B重组蛋白能促进下丘脑神经肽Y(NPY)的分泌和NPY, orexin mRNA的表达, 表明获得的重组蛋白在激素和基因水平上调控下丘脑摄食相关神经肽的表达, 具有明显的生物活性。研究结果可为半滑舌鳎orexin B蛋白的批量制备及高效促食生物制剂的研制提供技术支撑。

关键词: 半滑舌鳎; Orexin B; 原核表达; 生物活性

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

食欲素(orexin), 又称作下丘脑分泌素(hypocretin), 是1998年两个独立实验室分别发现的一组新型能够调节机体摄食和能量代谢的下丘脑神经多肽物质^[1]。其前体蛋白为preproorexin, 包括orexin A和orexin B(OXA、OXB)2种多肽。哺乳动物中, orexin主要由下丘脑神经元产生, 通过神经纤维投射或释放作用进入脑脊髓液行使生理功能, 与2种G蛋白耦联受体OX₁R和OX₂R结合后, 参与机体摄食、代谢、睡眠等生理过程的调节^[2-3]。

目前, 关于orexin编码的两个多肽, 以orexin A研究较多, orexin B相对较少^[4]。大鼠侧脑室灌注试验表明, orexin A与orexin B一样, 都具有促进摄食的功能, 且其作用效能相似^[5], 但orexin B的作用时间稍短, 尚未明确哪个在摄食过程中起主导调控作用。orexin B在系统进化发育中高

度保守, 如大鼠和小鼠的orexin B的氨基酸组成完全一致, 人orexin B与啮齿类、猪的orexin B仅分别有2个和1个氨基酸的差异, 揭示了其在生命演化过程中有着重要的生理功能^[6-8]。有学者比较分析了斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*oryzias latipes*)等5种鱼类的orexin氨基酸序列的系统进化特性, 发现斑马鱼、青鳉、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)的orexin B保守型明显高于orexin A, 三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)和河鲀(*Takifugu*)中则相似, 而在其他动物中orexin B保守性则低于orexin A^[9]。近年来, 本实验室开展了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) orexin的摄食与生长调控机制研究, 前期工作中已建立了半滑舌鳎orexin A重组蛋白制备技术, 且已证实其在体外具有调控下丘脑摄食因子的生物活性^[10]。作为orexin前体蛋白的两种水解肽之一, orexin B序列的高保守性

收稿日期: 2016-08-08 修回日期: 2017-02-23

资助项目: 国家鲆鲽类产业技术体系专项(CARS-50); 国家自然科学基金(31502145)

通信作者: 柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

预示了其功能在长期进化中的稳定性。半滑舌鳎为我国重要的海水养殖鱼类^[1],开展其orexin B的功能研究,将有助于全面认识orexin的生理功能,同时可为深入揭示其摄食调控机制提供新的认识基础。本实验建立了半滑舌鳎orexin B原核表达技术,获得了体外重组的纯化的orexin B蛋白,验证了其生物活性,为在蛋白层面上深入揭示半滑舌鳎摄食调控机制提供了理论与技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源

半滑舌鳎于2015年11月取自海阳市黄海水产有限公司。实验鱼3尾♀,全长(40.61±7.22) cm,体质量(1384±19.85) g,以MS-222(300 mg/L)麻醉处死后,置于冰板上迅速摘取脑组织投入液氮中保存,用于RNA提取。

实验用30尾半滑舌鳎成鱼,全长(32.00±3.70) cm,体质量(716.00±20.90) g,以MS-222麻醉致死后在冰板上快速摘取下丘脑,置于L15液体培养基中孵育处理,用于蛋白的生物活性测试分析。

1.2 orexin B成熟肽克隆与验证

提取脑组织总RNA(TRIzol法)后反转录合成第一链cDNA。根据本实验室克隆得到的半滑舌鳎orexin全长序列,经BLAST比对分析和预测,得到orexin B成熟肽序列,设计特异性引物P1和P2,扩增orexin B成熟肽序列。

在引物P1和P2序列的5'端分别设计限制性内切酶EcoR I和Xho I的酶切位点(方框标注),在引物P2序列中设计强终止密码子TAA(下划线标注),防止发生错误扩增。

P1: 5'- GAATTC GGAGAGGACGACCAC-3'
P2: 5'- CTCGAG TTACATGGTGAGGATCC-3'
PCR条件为94℃变性5 min, (94℃ 30 s、67℃ 30 s、72℃ 50 s)35个循环,最后72℃延伸10 min。对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。

1.3 表达重组质粒构建

将orexin B成熟肽重组质粒和pET-32a表达载体,分别利用限制性内切酶EcoR I和Xho I(Thermo)进行双酶切,切胶回收,以T4连接酶过夜连接

获得orexin B/pET-32a表达重组质粒。将表达重组质粒转化至pEASY-T1 Simple大肠杆菌感受态细胞(TransGen)中,菌液培养后PCR鉴定并测序验证。

1.4 重组质粒表达

将正确重组的orexin B/pET-32a表达质粒转化到菌株BL21(TransGen),在37℃条件下,液体LB培养基中(含氨苄霉素)培养至OD600 nm达0.6~0.7,添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG, 1 mmol/L)继续培养。

在IPTG诱导0、2、4、6、8和10 h时分别汲取2 mL表达菌液,离心收集菌体(8000 r/min, 5 min)以PBS洗涤重悬,以SDS-PAGE电泳(15%)和SigmaScan pro 5软件分析目的蛋白的表达效率。

设置22、27、32、37和42℃等5个温度梯度,将菌液在这5个温度下分别以1 mmol/L IPTG诱导6 h,计算温度对重组蛋白表达量的影响。

在37℃条件下,培养重组表达菌液至OD600值达0.6~0.7时,分别加入0.1、0.25、0.5、0.75、1.0和2.0 mmol/L的IPTG诱导剂,各自诱导6 h,观察不同IPTG浓度条件下重组蛋白表达量的变化。

1.5 Western-blotting验证重组蛋白特异性

收集37℃条件下以1 mmol/L IPTG诱导6 h的重组表达菌体,SDS-PAGE电泳后将目的蛋白转移至PVDF膜上(半干电转印法)。在室温条件下,按照5% BSA封闭1 h→6×His单抗(一抗)孵育2 h→山羊抗小鼠IgG (HRP标记二抗)孵育2 h→HRP-DAB试剂盒(Solarbio)显色的操作步骤,观察拍照得到的重组蛋白是否具有特异性。

1.6 重组蛋白的纯化

按照刘芝亮等^[12]建立的方法,对获得的目的重组蛋白进行纯化处理,简易流程如下:收集重组菌液→离心5 min (8000 r/min)→PBS洗涤沉淀→超声波破碎液(1/10体积)重悬→冰浴超声破碎→沉淀和上清中重组蛋白检测→0.45和0.22 μm微孔滤膜过滤上清液→Ni²⁺-NTA亲和层析柱纯化。

利用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo)测定纯化的重组蛋白浓度,以0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后,将目的重组蛋白置于-80℃条件下保存。

1.7 重组蛋白的生物活性验证

下丘脑离体孵育 摘取下丘脑后,先以

L15液体培养基清洗后再置于L15液体培养基(含10%小牛血清)中培养6 h,之后将下丘脑置于24孔细胞培养板中孵育。每个孵育孔放入1个下丘脑和1 mL L15培养液(无小牛血清),各孔按照不同浓度(0、1、10、100和1000 nmol/L)添加orexin B重组蛋白,每组设置3个平行。将下丘脑在CO₂细胞培养箱(Heal Force)中25 °C培养24 h后,分别收集孵育液和下丘脑分别用于NPY肽测定和NPY、orexin mRNA表达水平的检测。

NPY肽测定 孵育液中NPY表达水平用小鼠NPY Elisa试剂盒(北京康肽)检测(半滑舌鳎NPY与小鼠NPY相似性达91.0%)。测定操作按照说明书的规程进行,首先制作并获得了线性相关系数R值为0.99的标准曲线。其后,每一组织样品的分析进行3次平行试验,将测得值代入标准曲线,计算得到样品中NPY肽的浓度^[10]。

孵育下丘脑中NPY和orexin mRNA表达水平检测 提取离体孵育的下丘脑的总RNA,检测质量和浓度。根据半滑舌鳎orexin和NPY(GenBank序列号:XM_008331274)的cDNA序列分别设计定量引物,以18S为内参设计定量引物18S-F和18S-R(表1),检测NPY和orexin mRNA的表达水平变化。

利用SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)试剂盒检测基因的定量表达情况,qPCR扩增体系为20 μL,包括cDNA模板2 μL、10 μmol/L的上下游引物各0.8 μL、SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μL和ddH₂O 6.4 μL。以垂体cDNA为模板,以5倍梯度稀释成6个浓度梯度,制作各检测基因的标准曲线,计算相关系数(r^2)和扩增效率(E),确立最终实验条件。采用两步法PCR扩增,orexin的PCR条件:95 °C 30 s,40个循环(95 °C 5 s,59 °C

20 s);NPY的PCR反应条件:95 °C 30 s,40个循环(95 °C 5 s,60 °C 20 s)。定量检测仪器为Mastercycler ep realplex real-time PCR仪(Eppendorf)。

基因表达定量检测前,以熔融曲线法确定基因扩增的特异性。定量检测设置空白对照组,对3个平行的下丘脑组织样品,每个重复检测3次以保证其数据可靠性。以半滑舌鳎18S为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达量。

1.8 数据分析

实验数据均表示为mean±SD的形式。数据统计分析利用SPSS 17.0,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)不同试验组间差异显著性,设置显著性水平 $P=0.05$,当 $P<0.05$ 时表示差异显著。

2 结果

2.1 半滑舌鳎orexin B/pET-32a表达载体构建

克隆半滑舌鳎orexin B成熟肽片段,并与原核表达载体pET-32a成功重组,获得了orexin B/pET-32a重组表达载体(图1),通过计算得知将表达重组蛋白的分子量为21.14 ku,等电点为5.71。

半滑舌鳎orexin B氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性分析表明:半滑舌鳎orexin B与条斑星鲈(*Verasper moseri*)的同源性最高(93%),与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和斑马鱼也有较高的同源性,分别为89%、81%和78%,与人和小鼠的氨基酸序列的同源性也达68%(图2),表明半滑舌鳎orexin B具有较高的进化保守性,尤其是在C末端。

表 1 半滑舌鳎实时定量引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for qPCR analysis in the present study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences	作用 usage
orexin-F	GAATTCGAGAGGACGACCAC	orexin Real-time PCR
orexin-R	CTCGAGTTACATGGTGAGGATCC	
NPY-F	CCACAGACACACTCCACAATC	NPY Real-time PCR
NPY-R	GGCGACAGAGGATACAGGAG	
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	18S Real-time PCR
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	

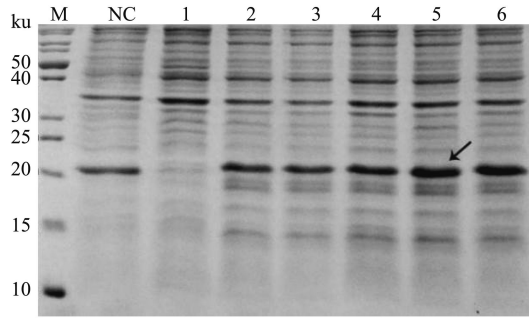


图5 IPTG浓度对半滑舌鳎orexin B重组蛋白表达的影响(37 °C, 诱导6 h)

M: Marker; 1~6: 浓度为0、0.25、0.5、0.75、1.0、2.0 mmol/L的IPTG诱导的orexin B重组蛋白(箭头)

Fig. 5 Effects of IPTG concentration on production of recombinant orexin B protein from *C. semilaevis*

M: Marker; 1~6: expression of recombinant orexin B protein post 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mmol/L of IPTG induction (arrow)

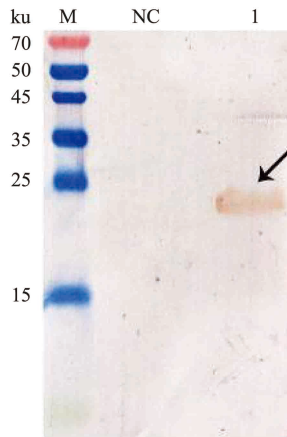


图6 半滑舌鳎orexin B重组蛋白的western-blotting检测(37 °C, 1.0 mmol/L IPTG诱导6 h)

M: marker; NC: 对照菌(空载质粒); 1: orexin B重组表达菌(箭头示目的蛋白阳性反应条带)

Fig. 6 Western-blotting verification of recombinant orexin B protein from *C. semilaevis* (37 °C, 6 h of induction with 1.0 mmol/L IPTG)

M: Marker; NC: control (blank); 2: recombinant orexin B protein reaction (arrow indicates the positive reaction band of target protein)

蛋白浓度的增加, 下丘脑分泌到孵育液中NPY肽的表达水平呈上升趋势, 并在100 nmol/L时达到峰值($P<0.05$), 其后保持较高表达水平($P<0.05$)。

随着外源orexin B重组蛋白浓度的增加, 离体孵育的下丘脑中NPY mRNA的表达水平呈先上升后下降的趋势, 在100 nmol/L时达到峰值($P<0.05$)。当外源orexin B重组蛋白为1 nmol/L

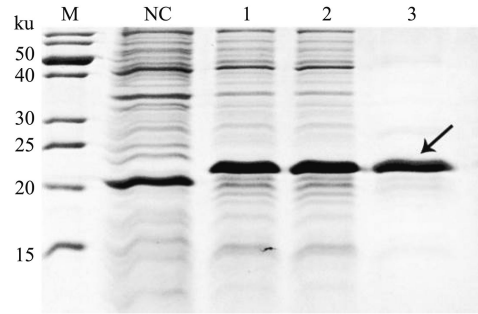


图7 半滑舌鳎orexin B重组蛋白的纯化(37 °C, 1.0 mmol/L IPTG诱导6 h)

M: Marker; NC: pET-32a空载质粒; 1: orexin B重组蛋白超声破碎后沉淀; 2: orexin B重组蛋白超声破碎后上清液; 3: orexin B纯化蛋白(箭头)

Fig. 7 Purification of recombinant orexin B protein from *C. semilaevis* (37 °C, 6 h of induction with 1.0 mmol/L IPTG)

M: Marker, NC: control, 1: inclusion bodies post ultrasonic disruption; 2: supernatant post ultrasonic disruption; 3: purified protein (arrow)

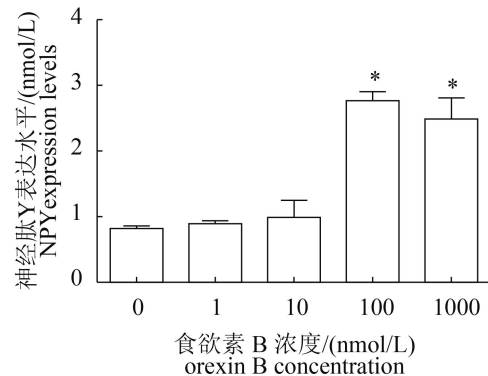


图8 重组orexin B蛋白对半滑舌鳎下丘脑孵育液中NPY肽表达水平的影响

*表示差异显著($P<0.05$)

Fig. 8 Effects of *C. semilaevis* orexin B recombinant protein on NPY peptide levels released from hypothalamus *in vitro*

* indicates significant difference ($P<0.05$)

时, 下丘脑orexin mRNA表达水平显著升高($P<0.05$), 其后随着orexin B蛋白浓度的增加, 其表达水平下降至与对照组无差异水平。

3 讨论

本实验首次实现了半滑舌鳎orexin B成熟肽的体外原核重组表达, 并获得了纯化的orexin B重组蛋白, 且通过离体孵育方法验证了重组

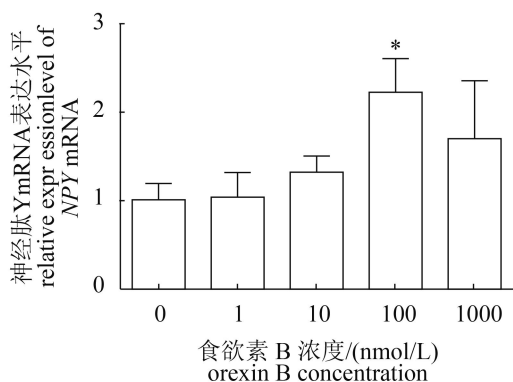


图9 orexin B重组蛋白对半滑舌鳎下丘脑NPY mRNA表达的影响
*表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 9 Effects of *C. semilaewis* orexin B recombinant protein on hypothalamus NPY mRNA levels
Note: * indicates significant difference ($P < 0.05$)

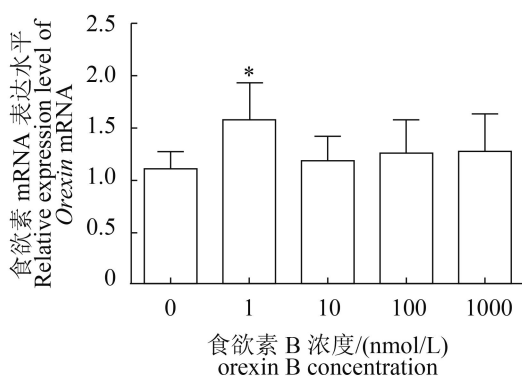


图10 重组orexin B重组蛋白对半滑舌鳎下丘脑orexin mRNA表达的影响

*表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 10 Effects of *C. semilaewis* orexin B recombinant protein on hypothalamus orexin mRNA

* indicates significant difference ($P < 0.05$)

orexin B蛋白具有促进下丘脑分泌NPY肽和NPY、orexin基因表达的生物活性。已有研究表明,鱼类中orexin、NPY都是促进摄食的正向调控因子^[12-13],本研究获得的半滑舌鳎orexin B重组蛋白也具有上调NPY和orexin mRNA表达的生理功能,表明同半滑舌鳎orexin A一样^[10],orexin B也参与了半滑舌鳎的摄食调控过程,为全面认识其摄食调控机制提供了新的基础资料。另有研究表明,orexin对鱼类生长与能量代谢等生理功能都具有重要的调控作用^[4],因此orexin B重组蛋白的获得与功能研究对于全面认识orexin对半滑舌鳎摄食和生长调控作用机制具有重要科学意义。

鉴于orexin在鱼类摄食与生长方面具有重要的生理功能,其在水产养殖上的应用潜力巨大。由于从鱼的血浆或组织中提取自然orexin难度大,利用重组制备技术体外获得足够的重组蛋白是开展其应用的必由途径。原核表达载体是目前获得基因体外表达的理想系统,其中大肠杆菌表达系统的研究最为深入,具有遗传背景清晰、表达量高、可供选择载体多、表达产物分离纯化简单及安全性高等优点^[14]。目前,pET系列载体是利用大肠杆菌表达蛋白研究中应用较为的载体类型,其具有基础表达水平低、利于目的蛋白高效表达的优点,同时带有His tag,有利于重组蛋白的层析纯化和验证^[15-16]。原核表达的产物主要有三种表达形式:融合型表达、非融合型表达和分泌型表达^[17]。本研究获得的半滑舌鳎orexin B重组蛋白属于融合型表达方式,重组蛋白主要在胞内表达,以超声破碎后检测主要存在于上清液中,大大减少了包涵体表达的比例,从而可避免因变性和复性操作带来的重组蛋白的降解及产量损失^[12, 17-19],提高了orexin B重组蛋白的表达效率。

已有研究证实,orexin在动物中扮演着促摄食调控因子的重要作用,如长期饥饿能够诱导斑马鱼下丘脑orexin mRNA表达水平显著升高^[20];对金鱼的研究表明,外源orexin可激发食欲明显增加,且orexin A与orexin B具有相似的促摄食机制^[21-22]。本研究发现,半滑舌鳎orexin B重组蛋白可在高浓度时促进下丘脑NPY肽的释放和NPY mRNA的上调表达,这与orexin A重组蛋白的生理作用类似,表明这两种多肽的重组蛋白具有相似的调控下丘脑NPY表达的机制^[10]。另外,orexin和NPY在动物摄食调控机制上存在协同作用,同时注射orexin和NPY的试验组引起的摄食量增加明显高于单独注射NPY组,并且注射orexin后下丘脑NPY基因的表达也会相应增加^[23]。对大鼠的研究表明,利用脑室灌注方法发现,若先于NPY注射orexin抗血清,将显著削弱NPY的促摄食作用,表明orexin与NPY之间的协同调控作用可能存在时序或剂量依赖关系^[5]。本研究通过下丘脑离体孵育验证了半滑舌鳎orexin B重组蛋白能够促进下丘脑分泌表达NPY,同时可上调下丘脑NPY mRNA表达水平,表明获得的orexin B重组蛋白能够在激素和基因水平调节促摄食因子表达,进而调控摄食增加。同时,我

他们还发现, 仅在低浓度时(1 nmol/L), orexin B重组蛋白对下丘脑*orexin* mRNA具有明显上调表达作用, 而高浓度则没有显著促进其表达, 可能是外源orexin与内源性orexin存在拮抗或者平衡调节的作用。本实验还发现, 低浓度的orexin B重组蛋白(1 nmol/L)显著促进下丘脑*orexin* mRNA的上调表达, 而低浓度orexin A重组蛋白则显著抑制下丘脑*orexin* mRNA表达, 表明半滑舌鳎orexin两种体外重组蛋白对内源性*orexin* mRNA的调控作用存在差异, 亟待深入开展研究以阐释其可能机制。

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] Yan A F, Zhang L J, 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.
- [3] Fernø J, Señaris R, Diéguez C, *et al.* Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 418: 17-26.
- [4] Panula P. Hypocretin/orexin in fish physiology with emphasis on zebrafish[J]. *Acta Physiologica*, 2010, 198(3): 381-386.
- [5] Novak C M, Kotz C M, Levine J A. Central orexin sensitivity, physical activity, and obesity in diet-induced obese and diet-resistant rats[J]. *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, 2006, 290(2): E396-E403.
- [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] 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.
- [8] 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).
- [9] 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.
- [10] 李斌, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鳎食欲素A体外重组表达及活性分析[J]. *水产学报*, 2016, 40(9): 1462-1471.
- Li B, Xu Y J, Liu X Z, *et al.* Prokaryotic expression and bioactivity analysis of orexin A from *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(9): 1462-1471(in Chinese).
- [11] 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).
- [12] 刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鳎类胰岛素生长因子-1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* Günther[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 706-712(in Chinese).
- [13] Volkoff H, Xu M Y, MacDonald E, *et al.* Aspects of the hormonal regulation of appetite in fish with emphasis on goldfish, Atlantic cod and winter flounder: Notes on actions and responses to nutritional, environmental and reproductive changes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 153(1): 8-12.
- [14] Hu S Y, Wu J L, Huang J H. Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107(2): 161-171.
- [15] 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.
- [16] 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).
- [17] 宁俊凯. 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)原核制备工艺进展[J]. 海峡药学, 2012, 24(6): 8-12.
Ning J K. Progress in prokaryotic preparation technique for insulin-like growth factor I (IGF-I)[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2012, 24(6): 8-12(in Chinese).
- [18] 叶星, 白俊杰, 劳海华, 等. 草鱼胰岛素样生长因子-I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-I[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(2): 122-126(in Chinese).
- [19] 柳学周, 刘芝亮, 徐永江, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)生长激素体外重组表达及活性分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1374-1379.
Liu X Z, Liu Z L, Xu Y J, *et al.* *In vitro* prokaryotic recombinant expression and bioactivity assay of growth hormone from *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(6): 1374-1379(in Chinese).
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Alvarez C E, Sutcliffe J G. Hypocretin is an early member of the incretin gene family[J]. Neuroscience Letters, 2002, 324(3): 169-172.
- [23] 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).

In vitro* recombinant expression and bioactivity analysis of orexin B from *Cynoglossus semilaevis

XU Yongjiang^{1,2}, LI Bin^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2*}, ZHANG Kai³,
SHI Bao^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, SONG Xuesong^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China;

3. Qingdao Beibao Marine Science and Technology Co. Ltd., Qingdao 266400, China)

Abstract: In 1998, the orexin was independently discovered by two different laboratories, and it was latterly proved to have wide functions in feeding promotion, energy balance regulation, growth and reproduction in vertebrates. It is secreted and released from hypothalamus and can encode two peptides, orexin A and orexin B. They exhibit high conservation in sequence during evolution, and the prior research verified that they both have important functions in feeding regulation and energy metabolism in mammals and fish. *Cynoglossus semilaevis* is an important economic farmed flatfish and a favorite table fish in China. Its farming industry is expanding, however, the endocrine mechanisms underlying growth and feeding actions remain limited. To explore the possible endocrine mechanisms for food intake regulation of *C. semilaevis*, the matured peptide fragment of orexin B was amplified and subcloned into the prokaryotic expression vector pET-32a to successfully construct orexin B/pET-32a recombinant plasmid. The recombinant plasmid was high-efficiently expressed in *E. coli* BL21 strains after being induced by IPTG with special fusion polypeptides containing His6 at their N-terminus. The molecular weight of obtained orexin B polypeptide is 21.14 ku and maximally accounted for 43.5% of the whole bacterial protein post 6h induction with 1.0 mmol/L IPTG at 37 °C. Western blotting analysis indicated that the recombinant polypeptides had the antigenicity to His6 antibody. The recombinant protein could be purified using Ni²⁺-NTA affinity chromatography. *In vitro* incubation of hypothalamus with recombinant expression orexin B of *C. semilaevis* indicated that it could promote the secretion and release of NYP peptide from hypothalamus, and upregulate the expression level of *NPY* mRNA. Meanwhile, the recombinant orexin B protein also could upregulate the expression level of *orexin* mRNA in hypothalamus at low concentration. All these verified that the obtained recombinant orexin B protein has biological activity in the present study. The present results would be helpful for better understanding the role of orexin B in feeding regulation and development of high-efficient feed additive for farming industry of *C. semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; orexin B; prokaryotic expression; bioactivity analysis

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

Funding projects: China Agricultural Research System (CARS-50); National Natural Science Foundation of China (31502145)