

花鳗鲡重组促黄体生成素在毕赤酵母中的表达^{*}

毛黎敏^{1,2}, 张勇², 李阳源², 黄海^{1,2}, 李波²,
李文笙², 陈国华¹, 林浩然^{1,2}

(1. 海南大学海洋学院暨热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228;
2. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//中山大学水生经济动物
研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 采用聚合酶链反应从花鳗鲡垂体 cDNA 中分别扩增出 $GTH\alpha$ 、 $LH\beta$ 基因, 再利用搭桥技术, 中间以 linker 将两个基因连接成单个基因 $LH\beta\alpha$ 。然后利用双酶切、连接, 将 $LH\beta\alpha$ 基因连接到载体 pPICZ α A 中, 构建出促黄体生成素的酵母共表达载体 pPICZ α A- $LH\beta\alpha$ 。再利用电转化法将其转入到酵母野生型菌株 X-33 中, 在含不同浓度的 zeocin YPDS 平板上筛选高拷贝转化子, 阳性克隆经 $\phi = 0.7\%$ 甲醇诱导表达, 表达产物采用 SDS-PAGE 和 western blot 进行分析, 得到所表达的产物相对分子质量约为 45 000。

关键词: 花鳗鲡; 促黄体生成激素; linker; 共表达载体 pPICZ α A- $LH\beta\alpha$; 毕赤酵母

中图分类号: Q575⁺.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2012) 02-0086-06

Expression of A Recombinant Luteinizing Hormone of Marble Eels, *Anguilla marmorata* Using Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*

MAO Limin^{1,2}, ZHANG Yong², LI Yangyuan², HUANG Hai^{1,2}, LI Bo²,
LI Wensheng², CHEN Guohua¹, LIN Haoran^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Biology Resources, Ministry of Education, College of Ocean,
Hainan University, Haikou 570228, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial
Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The $GTH\alpha$ 、 $LH\beta$ gene fragments were amplified by PCR, which the template was pituitary cDNA of marble eels. In the way of bridging, the two fragments were connected to a single gene $LH\beta\alpha$, a linker inserted between them. The $LH\beta\alpha$ gene fragment was subcloned to pPICZ α A with double enzyme digestion and connection, constructing eukaryotic co-expression plasmid pPICZ α A- $LH\beta\alpha$. The recombinant plasmid was transfected into a native yeast strain X-33 by electrotransformation. The high-copy clones were selected by the YPDS plates containing different concentrations of Zeocin. The positive clones were induced by 0.7% methanol and expression products were tested by SDS-PAGE and western blot, and its molecular weight was determined as about 45 000.

Key words: *Anguilla marmorata*; luteinizing hormone; linker; co-expression plasmid pPICZ α A- $LH\beta\alpha$; *Pichia pastoris*

* 收稿日期: 2010-03-09

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(30770283); 广东省教育部产学研结合资助项目(2010B090400551); 江苏省科技成果转化专项资金资助项目(BA2009083); 海南省教育厅高等学校科学研究资助项目(Hjkj20082 22)

作者简介: 毛黎敏(1986年生), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 林浩然; E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

花鳗鲡 *Anguilla marmorata* 属于鳗鲡目 Anguilliformes、鳗鲡科 Anguillidae、鳗鲡属 *Anguilla*，在我国主要分布于海南、福建、广东、浙江沿海江河，是我国鱼类中名贵的经济鱼类之一。近年来，由于过度捕捞、环境污染、拦河建坝等原因，导致花鳗鲡的自然资源剧减，我国已将其列为二级保护动物。目前，海南、广东等地积极发展花鳗鲡人工养殖业，市场前景广阔，产业发展势头良好。然而，鳗鲡人工繁育技术至今尚未解决。花鳗鲡的苗种完全依赖对天然苗种的捕捞，这不仅严重影响了养鳗产业的健康持续发展，而且对天然鳗鲡资源的保护与合理利用造成威胁。因此，开展花鳗鲡人工繁育研究迫在眉睫。

鱼类的生殖活动受到脑 - 脑垂体 - 性腺轴调控。下丘脑分泌促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 刺激脑垂体促性腺激素 (Gonadotropin Hormone, GTH) 的合成与释放。促性腺激素与其受体相结合后，诱导性腺细胞产生性类固醇激素，促进性腺的发育与成熟。脊椎动物具有两种 GTH：促滤泡刺激激素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH) 和促黄体生成激素 (Luteinizing Hormone, LH)。它们是由异源二聚体组成的糖蛋白激素，由共同的 α 亚基通过非共价键与特异的 β 亚基相连，即促黄体激素 (LH) 由 $GtH\alpha$ 与 $LH\beta$ 组成，促卵泡激素 (FSH) 由 $GTH\alpha$ 与 $FSH\beta$ 组成^[1]。对日本鳗鲡 *Anguilla japonica* 的研究表明：FSH 能诱导未成熟雄性日本鳗鲡雄激素增加，促进精巢发育^[2-3]；LH 能促进卵母细胞发育成熟^[4]。因此，我们拟采用基因重组表达的花鳗鲡促性腺激素来诱导花鳗鲡性腺发育成熟。在克隆出花鳗鲡促性腺激素基因 cDNA 的基础上，建立高效表达花鳗鲡促黄体生成激素 (LH) 的真核表达系统体系，表达出有生物活性的促性腺激素，以期用于花鳗鲡人工诱导花鳗鲡性腺发育成熟等基础研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株及载体 DH5 α 感受态细胞、毕赤酵母表达载体 pPICZ α A、野生型毕赤酵母菌株 X-33 均为本实验室保存。

1.1.2 主要药品与试剂 限制性内切酶 *Xba*I、*Eco*RI、*Dra*I、Blend Taq 酶购自 TOYOBO 公司；Pfx 高保真性酶购自 invitrogen 公司；T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；Peptone、Yeast Extract 为 Oxoid

LTR. Co. td 产品、YNB 为 Difco (USA) 产品；抗生素 Zeocin 购自 Invitrogen 公司；His-Tag、羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的二抗为博士德生物工程有限公司 (武汉) 产品；PCR 引物合成和 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成，其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 大肠杆菌培养用 LB 低盐培养基 (zeocin 终质量浓度为 0.25 μ g/mL)，酵母培养采用 YPD、YPDS (zeocin 抗生素质量浓度分别为 100, 200, 500 μ g/mL)、BMGY、BMMY 培养基，配方见 invitrogen 公司的酵母表达手册。

1.2 方法

1.2.1 *GTH* α 和 *LH* β 基因片段的扩增 根据本实验室所克隆出的 *GTH* α (GenBank 序列号: FJ490345)、*LH* β (GenBank 序列号: FJ490347) 分别设计引物 PG1、PG2、PL1、PL2 (表 1)，以花鳗鲡脑垂体 cDNA 为模板，分别扩增基因片段 *GTH* α 、*LH* β 。所扩增的片段 *GTH* α 、*LH* β 分别经胶回收、与 pGEM-T 载体连接、转化入感受态 DH5 α 细胞中，分别挑取 3 个阳性克隆进行 DNA 序列测定。测序正确的阳性质粒分别命名为 T-*GTH* α 、T-*LH* β 。

1.2.2 pPICZ α A-*LH* β α 重组表达质粒的构建与鉴定

据所测质粒 T-*GTH* α 、T-*LH* β 的序列设计引物 PG3、PG4、PL3、PL4，PG3 引入 *Eco*RI 酶切位点；PL4 引入 *Xba*I 酶切位点；PG4、PL3 均引入 linker (Gly-Ser) \times 3 (引物序列见表 1)。第一轮 PCR 以 T-*GTH* α 、T-*LH* β 质粒为模板，引物分别用 PG3、PG4、PL3、PL4 进行 PCR 扩增，扩增的酶用 invitrogen 公司的 Pfx 高保真酶，并回收产物；第二轮 PCR 则以第一轮产物当作第二轮的模板和引物，扩增的酶用 TOYOBO 公司的 Blend Taq 酶，进行扩增，回收所需目的大小的条带。6His 标签和终止密码子均为载体上自带。

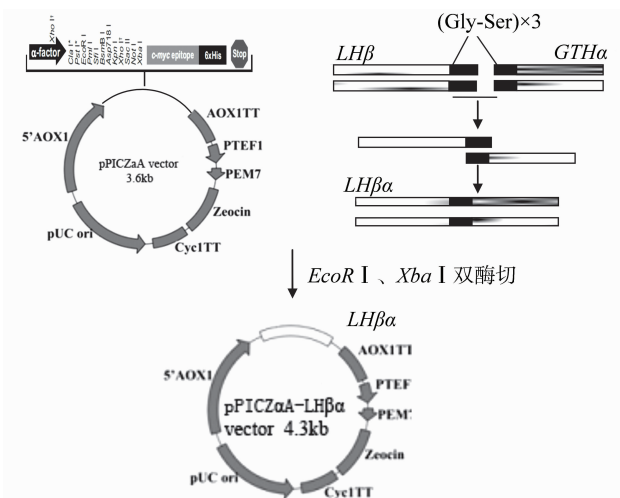
将目的片段与空载体 pPICZ α A 均用 *Eco*RI、*Xba*I 进行双酶切、胶回收，再将酶切回收产物连接、转化到 DH5 α 感受态细胞中 (构建示意图见图 1)。小量提取质粒进行 PCR 与双酶切鉴定，分别选取 3 个阳性克隆进行 DNA 序列测定。序列正确的阳性共表达质粒命名为 pPICZ α A-*LH* β α 。

1.2.3 电转入酵母菌株中 根据分子克隆实验指南大量制备和提取质粒 pPICZ α A-*LH* β α ，并测定 pPICZ α A-*LH* β α 的浓度。将质粒 pPICZ α A-*LH* β α 用限制性内切酶 *Dra*I 进行线性化、胶回收。

表 1 克隆所用引物序列

Table 1 The sequences of clone primers

基因名称	引物	引物序列 (5'—3')	备注
<i>GTHα</i>	PG1	AACAACGAAATGGCACGAGGT	
	PG2	CTCCAGTTTCATGTTATCCAG	
	PG3	GTTTCTGGTTCGTTCTAACAACGAA	划线为
		ATGGCA	(Gly-Ser) \times 3
PG4	GCTCTAGACTCCAGTTTCATGTT	划线为 <i>Xba</i> I 位点	
<i>LHβ</i>	PL1	TTACTGCTGCCTTGTGAGCCA	
	PL2	CGCGGGGAGGCTGGCCCGCTGGCTCAT	
	PL3	CGGAAATCTTACTG CTGCCTTGTGAG	划线为
		CCA	<i>Eco</i> RI 位点
PL4	AGAACCAGAACCAGAACCCGCGGGG	划线为	
	AGGCTGGCCCGCTG	(Gly-Ser) \times 3	

图 1 pPICZ α A-LH β α 载体构建示意图Fig. 1 The diagram of constructing co-expression plasmid pPICZ α A-LH β α

将所线性化的约 10 μ g 共表达质粒 pPICZ α A-LH β α 电转化到毕赤酵母菌株 X-33 中, 并涂布于 YPDS 平板上 (YPDS 平板中 zeocin 抗生素的质量浓度分别为 100, 200, 500 μ g/mL), 筛选生长表型, 该菌命名为 pPICZ α A-LH β α -X33。

1.2.4 重组菌的发酵 在高抗生素的 YPDS 平板上挑取阳性克隆 4 个, 接种于 BMGY 培养液中, 28 $^{\circ}$ C 培养过夜, 直至 A_{600} 达到 2~6 时, 离心、去除上清, 沉淀加 5 mL BMMY 溶解, 甲醇的终体积分数为 0.7%。分别在 24, 48, 72, 96 h 取样并补加甲醇, 维持甲醇终体积分数为 0.7%, 于 28 $^{\circ}$ C 下诱导表达。同时, 做两个阴性对照, 一个挑取 YPDS 平板上的 pPICZ α A-LH β α 阳性克隆, 进行培

养, 但不加甲醇诱导; 另一个对照为空载体 pPICZ α A, 进行培养, 同时甲醇诱导体积分数为 0.7%。每次所取的样参照 TCA 蛋白沉淀法沉淀蛋白后, 用 SDS-PAGE 和 western blot 检测上清中的表达产物。Western blot 检测时, His-Tag 作为一抗, 浓度为 1:2 000, 室温、摇床上孵育 2 h; 二抗用羊抗鼠辣根过氧化物酶作标记, 浓度为 1:2 000, 室温摇床上孵育 1 h, ECL 显色。

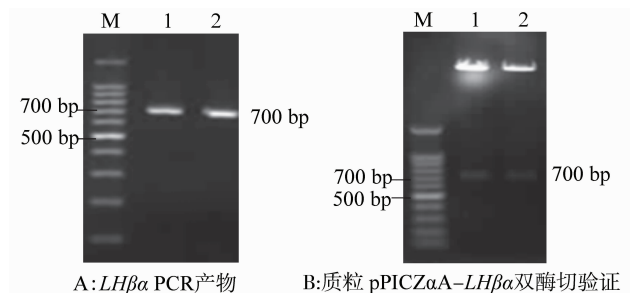
2 结果

2.1 *LH β* 、*GTH α* 片段的扩增

琼脂糖凝胶电泳显示, 产物 *GTH α* 大小 296 bp、*LH β* 大小为 348 bp, 回收后与 pGEM-T 载体重组, 重组质粒经 DNA 序列分析证实: 扩增片段均与预期结果一致。

2.2 pPICZ α A-LH β α 重组表达质粒的鉴定

基因片段 *GTH α* 、*LH β* 经搭桥连接成单一片段 *LH β α* 成功, 其片段大小约为 700 bp (见图 2)。重组质粒 pPICZ α A-LH β α 分别经 *Eco*RI、*Xba*I 双酶切鉴定、DNA 序列分析与预期结果相符, 氨基酸序列没有移码突变。

图 2 *LH β α* 基因片段验证图Fig. 2 The diagram of detecting the gene *LH β α*

A: analysis of *LH β α* PCR products; M: maker; Lane 1-2: PCR products; B: recombinant plasmid pPICZ α A-LH β α digested by *Eco*RI and *Xba*I; M: maker; Lane 1-2: digested products

2.3 表达菌株的阳性筛选

pPICZ α A-LH β α 重组质粒电转化入 X-33 酵母菌株, 并涂布在含有高抗生素 Zeocin 的 YPDS 平板上, 结果在质量浓度 100 μ g/mL 上约生长出 150~200 个单菌落、200 μ g/mL 上约生长出 40~60 个单菌落, 而 500 μ g/mL 的平板上则没有菌落生长。所以在 200 μ g/mL 的平板上挑取阳性菌。

2.4 SDS-PAGE 分析和 Western blot 检测目的蛋白 将所摇菌的 4 个样分别进行 SDS-PAGE 电泳和

western blot 检测, 结果 LH $\beta\alpha$ 重组蛋白表达量以 96 h 最高, 大小约为 45 000, 抗生素质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 甲醇终体积分数为 0.7%, PH6.0 (图 3)。

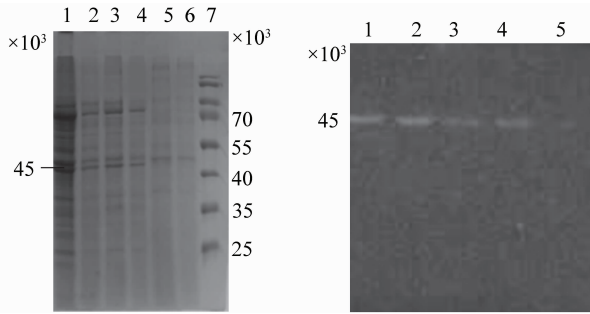


图 3 LH $\beta\alpha$ 表达蛋白检测图

Fig. 3 Expression of LH $\beta\alpha$ protein detections

- A: 重组蛋白 LH $\beta\alpha$ 的 SDS-PAGE 电泳分析;
B: 重组蛋白 LH $\beta\alpha$ 的 Western blot 检测

3 讨论

在鱼类中, 对促性腺激素的结构与功能的联系研究较少^[5]。主要是因为很难获得足够量的 GTHs。其次, LH 和 FSH 具有很多相似的化学性质, 所以要分离纯化天然 LH 和 FSH 很困难。而重组蛋白的表达则能较好的解决这一问题, 同时重组蛋白的获得对于抗体的制备、三级结构的研究以及进一步研究蛋白的功能等都具有非常重要的意义^[6]。促性腺激素是由异源二聚体组成的糖蛋白激素, 亚基的分离会影响异源二聚体蛋白的生物活性^[5]。同时, 促性腺激素 α 亚基的 C-末端和 β 亚基的 N-末端的所形成的区域利于其与促性腺激素受体结合^[7-8]; 而 α 亚基的 N-末端和 β 亚基的 C-末端则不能促进其与受体的结合和信号转导^[9-10]。所以, 本文将 LH β 亚基与 GTH α 连接成一个共表达基因 LH $\beta\alpha$, N-末端为 β 亚基, C-末端为 α 亚基 (见图 1)。

本研究在 LH β 与 GTH α 亚基之间, 引入了含六个氨基酸的 linker, 即 (Gly-Ser) $\times 3$ 。人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 已经在毕赤酵母中成功表达^[11-12]。在 hCG 中, β 亚基的 C-末端的最后 30 个氨基酸包含有 C-末端肽 (CPT), 它起到一个 linker 的作用, 在异源二聚体的连接上起到至关重要的作用^[13]。在内源性的促卵泡激素二聚体蛋白中, 只有当 FSH β 的 C 末端或 GTH α 的 N 末端含有 CPT 时, 才能进行正常的合成、分泌、信号转

导^[9,10,13]。花鳉 LH 缺乏 CPT 或者 CPT 类似结构, 所以 LH $\beta\alpha$ 之间引入 (Gly-Ser) $\times 3$ 的 linker。而 Gly-Ser 重复序列是带负电荷的、具有强亲水性, 在 β 与 α 亚基之间能够提供足够的空间供亚基的折叠, 形成与内源蛋白结构相近的、并能与其受体结合。两基因间引入 linker 的方法在其他共表达基因中也常用到, 如 IL-3 和 GM-CSF^[14]、特异型抗体与 GM-CSF^[15] 等。

在对日本鳉的研究表明脑垂体合成与分泌的促性腺激素 (GTH) 在性腺发育成熟中发挥主要作用。在养殖条件下, 鳉由于缺乏适合的生态环境, 促性腺释放激素和促性腺激素未能充分分泌和发挥作用, 使得性腺发育成熟、排卵、排精等生理过程无法完成。注射鱼类脑垂体或 hCG 已经被成功用于诱导日本鳉和欧洲鳉的性腺发育成熟和产卵, 但结果还不理想, 存在亲鳉对激素反应慢、诱导性腺发育成熟效应差, 成熟率、受精率和存活率低, 仔鱼不能正常发育等问题^[16-18]。这可能和这些异源促性腺激素不能完全代替同源促性腺激素的生理作用, 造成性腺发育与成熟异常有关。近年来, 许多鱼类的促性腺激素基因重组已在几种表达体系中成功表达, 如大马哈鱼的 LH 在大肠杆菌中表达^[19]; 非洲鲶鱼的 FSH 和 LH 在变形虫表达^[20]; 日本鳉的 FSH^[4] 和罗非鱼的 LH^[21] 在酵母中表达; 鲤鱼的 GTH- α 亚基^[22]、鲶鱼 FSH 和 LH^[23] 在昆虫细胞中表达; 斑纹鲈的 FSH 和 LH^[24]、东北鲑鱼 LH^[25] 在哺乳动物细胞中表达; 金鱼的 FSH、LH 在虹鳉胚胎细胞与家蚕幼虫中表达^[26]; 斜带石斑鱼的 FSH 和 LH^[27] 在杆状病毒-昆虫细胞中表达, 并研究发现重组促性腺激素, 可以刺激石斑鱼性类固醇激素的分泌, 进而促进性腺发育与成熟。因此, 获得重组促性腺激素, 以诱导鳉性腺发育成熟与产卵是解决鳉人工繁殖的关键之一。

然而, 不管是昆虫表达还是哺乳动物表达体系表达重组蛋白, 存在耗费大、实验操作难、很难大规模的扩大培养, 不利于纯化。而用甲醇诱导的酵母表达系统表达重组蛋白, 不需要耗费特殊昂贵的仪器、操作简便、同时能够大规模的发酵培养。其次, 毕赤酵母表达系统具有很强的蛋白质修饰功能, 如二硫键的形成、糖链的加工, 对重组表达蛋白的 N 端进行糖基化。N-连接糖基位点在 GTH 的功能活性非常重要, 特别是在糖蛋白激素与受体结合后激活 G 蛋白和刺激二级信号方面特别重要^[28]。再次, 毕赤酵母表达系统将外源基因表达

的蛋白分泌到细胞外,从而利于表达产物的分离纯化。而外源蛋白需要分泌到细胞外,则需要在选择添加前导肽。当产物浓度高可能会引发一些自身的调节抑制表达^[29],同时胞外分泌表达也可以减少下游的纯化工序。但胞外表达是需要载体中使用信号肽,而毕赤酵母的表达载体中不仅含有强启动子-乙醇氧化酶(AOX1)基因启动子,能够严格调控外源基因的表达,同时AOX1启动子与多克隆位点之间含有一段 α 信号肽,所以表达外源基因时不需要另外添加信号肽,直接添加编码成熟肽的碱基序列,从而使表达系统更加简单、高效。

所以本研究选用毕赤酵母表达系统表达重组花鳉促黄体激素,且已经成功表达,将可以进行下一步功能、抗体等方面的研究,不仅充实花鳉生殖内分泌学,而且可为花鳉及其他鳉人工繁育打下坚实基础。

参考文献:

- [1] GHARID S D, WIERMAN M E, SHUPNIK MA. Molecular biology of the pituitary gonadotropins [J]. *Endocr Rev*, 1990, 11: 177 - 190.
- [2] KAMEI H, OHIRA T, YOSHIURA Y. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese eel, *Anguilla japonica*, using methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 134: 244 - 254.
- [3] KAMEI H, KAWAZOE I, KANEKO T. Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its biochemical properties and steroidogenic activities [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 15;143(3):257 - 266.
- [4] HAN Y S, LIAO I C, HUANG Y S. Profiles of PGH I - α , GTH I - β , and GTH II - β mRNA transcript levels at different ovarian stages in the wild female Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 133: 8 - 16.
- [5] HAREL KASUTO, BERTA LEVAVI-SIVAN. Production of biologically active tethered tilapia LH β α by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 140 (2005) : 222 - 232.
- [6] HIROYASU KAMEI, TSUYOSHI OHIRA, YASUTOSHI YOSHIURA, et al. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese Eel *Anguilla japonica* using methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 134:244 - 254.
- [7] CHEN F, WANG Y, PUETT D. The carboxy-terminal region of the glycoprotein hormone alpha-subunit: contributions to receptor binding and signaling in human chorionic gonadotropin [J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6: 914 - 919.
- [8] HUANG J, CHEN F, PUETT D. Amino/carboxyl-terminal deletion mutants of human chorionic gonadotropin beta [J]. *Biol Chem*, 1993, 268: 9311 - 9315.
- [9] FURUHASHI M, SHIKONE T, FARES F A, et al. Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) beta-subunit to the common alpha-subunit: retention of O-linked glycosylation and enhanced in vivo bioactivity of chimeric human CG [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9: 54 - 63.
- [10] FARES F A, SUGANUMA N, NISHIMORI K, et al. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4304 - 4308.
- [11] SEN GUPTA C, DIGHE R R. Hyperexpression of biologically active human chorionic gonadotropin using the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 22: 273 - 283.
- [12] SEN GUPTA C, DIGHE R R. Biological activity of single chain chorionic gonadotropin, hCG α β , is decreased upon deletion of Wve carboxyl terminal amino acids of the alpha subunit without affecting its receptor binding [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 24: 157 - 164.
- [13] SUGAHARA T, PIXLEY M R, MINAMI S, et al. Biosynthesis of a biologically active single peptide chain containing the human common alpha and chorionic gonadotropin beta subunits in tandem [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2041 - 2045.
- [14] CURTIS B M, WILLIAMS D E, BROXMEYER H E, et al. Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1991, 88: 5809 - 5813.
- [15] TAO M H, LEVY R. Idiotype/granulocyte-macrophage colony stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 1993, 362: 755 - 758.
- [16] OHTA H, KAGAWA H, TANAKA H, et al. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1997, 17: 163 - 169.
- [17] LIN H R, XIE G, ZHANG L H, et al. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Bull Fr Peche Piscic*, 1998, 349: 163 - 176.

- [21] 施正峰, 梅志平, 罗其智. 日本沼虾能量收支和利用效率的初步研究[J]. 水产学报, 1994, 18 (3) : 191 - 197.
- [22] 董双林, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾生理生态学研究 - PH, Ca²⁺ 和 NaCl 对耗氧率和氨排泄的影响[C]//中国动物学会成立 60 周年论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 176 - 182.
- [23] SPAARGAREN D H, RICHARD P, CECCALDI H J. Excretion of nitrogenous products by *Penaeus japonicus* Bate in relation to environmental osmotic conditions [J]. Comp Biochem Physiol, 1982, 72A: 673 - 678.
- [24] CHEN Jianchu, NAU Fanhua. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus chinensis* juveniles at different salinity levels (Decapod, Penaeidae) [J]. J Crusta Biol, 1995, 15 (3) : 434 - 443.
- [25] LEI C H, HISEH L Y, CHEN C K. Effects of salinity on the oxygen consumption and ammonia excretion of young juveniles of the grass shrimp *Penaeus monodon* Fabricius [J]. Bull Inst Zool Academic Sinica, 1989, 28: 245 - 256.
- [26] NELSON S G, KNIGHT A W, LI H W. The metabolic cost of food utilization and ammonia production by juvenile *Macrobrachium rosenberg* (Crucea: Palaemonidae) [J]. Comp Biochem Physiol, 1977, 57A: 67 - 72.

~~~~~  
(上接第 90 页)

- [18] PEDERSEN B H. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla* [J]. Aquaculture, 2004, 237 : 461 - 473.
- [19] HEW C L, TRINH K Y, DU S J, et al. Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones [J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7: 375 - 380.
- [20] VISCHER H F, GRANNEMAN J C M, LINSKENS M H K, et al. Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor [J]. Mol Endocrinol, 2003, 31: 133 - 140.
- [21] KASUTO H, LEVAVI-SIVAN B. Production of biologically active tethered tilapia LHβα by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 140: 222 - 232.
- [22] HUANG C J, HUANG F L, CHANG G D, et al. Expression of two forms of carp gonadotropin α subunit in insect cells by recombinant baculovirus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7486 - 7490.
- [23] ZMORA N, KUMAR S, KAZETO Y, et al. Production of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) recombinant gonadotropins using the S2 Drosophila cell line system [J]. Fish Physiol Biochem, 2003, 28: 475 - 477.
- [24] BLAISE O, SZKUDLINSKI M, HASSIN S, et al. Production of recombinant striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropins in Chinese hamster ovarian (CHO) cell expression system [C]// NORBERG B, et al. Proceedings, 2003.
- [25] CHOI E J, JIN D H, SOHN Y C. Gonadotropins in the Manchurian trout, *Brachymystax lenok tsinlingensis* [J]. Fish Physiol Biochem, 2003, 28: 89 - 90.
- [26] KOBAYASHI M, MORITA T, Ikeguchi K, et al. In vivo biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae [J]. Aquaculture, 2006, 256 : 433 - 442.
- [27] CUI M, LI W S, LIN H R. Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) luteinizing hormone in insect cells by the baculovirus expression system and its biological effect [J]. Biology of Reproduction, 2007, 76: 74 - 78.
- [28] BEITINS I Z, PADMANABHAN V. Bioactivity of gonadotropins. Endocrinol Metab Clin North Am, 1991, 20 (1) : 85 - 120.
- [29] YANG Guowu, ZHOU Huiqiong, LUA Yongjun, et al. Comparing expression of different forms of human DNA topoisomerase I in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34: 139 - 146.