

史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 两种促性腺激素 β 亚基的原核表达*

胡红霞^{1,2}, 贝锦新¹, 刘晓春¹, 张 勇¹, 林浩然¹

(1. 中山大学水生经济动物研究所和广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 国家淡水渔业工程技术研究中心暨北京市水产科学研究所, 北京 100068)

摘 要: 采用遗传工程方法, 重组表达史氏鲟两种促性腺激素 β 亚基蛋白。选用原核表达载体 pET-22b (+), 分别插入史氏鲟 GtH I & II β 亚基成熟肽 cDNA 序列, 构建成 C 端含有 6 个组氨酸 (6-His) 融合蛋白标签的表达质粒; 分别转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 并诱导表达 2 个基因。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示重组融合蛋白相对分子质量分别为: GtH I β 亚基大约 14 000, GtH II β 亚基 15 000 左右。分别用抗 6 个组氨酸融合标签的单克隆抗体及兔抗鲟鱼 GTH 多克隆抗体对 2 个表达蛋白进行 Western-Blot 分析, 结果显示重组蛋白表达正确且有较高的免疫活性。GTH I β 重组蛋白在 2 h 就有明显的表达, 6 h 后随着时间增加表达量不再增加; 25 °C 诱导重组蛋白产量比 37 °C 诱导产量低。获得的重组蛋白质将可用于建立鲟鱼 GtH 的放射免疫测定方法。

关键词: 史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*); 促性腺激素; β -亚基; 蛋白质; 遗传工程

中图分类号: Q78, S96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 02-0089-04

鲟鱼属于大型经济鱼类, 目前全世界范围野生鲟鱼资源数量急剧下降。近几年, 鲟鱼养殖业发展很快, 但苗种短缺制约了其产业化发展。史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 是我国特有的鲟鱼之一, 养殖苗种主要依靠捕捞黑龙江流域进行生殖洄游的野生亲鱼, 剖腹取卵进行人工繁殖。自然资源的日渐枯竭以及各国政府和组织保护措施加强, 使未来鲟鱼养殖业的发展必须依靠人工养殖条件下培育出性成熟的鲟鱼用于繁殖。但是在养殖鲟鱼过程中发现雌鱼性腺发育严重不同步^[1]、对催产激素的敏感性个体差异较大^[2]等问题, 因此必须对人工养殖鲟鱼的繁殖生理进行深入研究。

鱼类促性腺激素 (GTH) 是脑垂体分泌的促进性腺发育和繁殖的主要内分泌激素, 是鱼类繁殖生理学研究的重要内容。实践表明, 多种鱼类在人工养殖条件下性腺不能正常发育, 主要原因是培育条件与野生环境相差较大, 不能刺激鱼体产生足够量的 GtH^[3]。

到目前已经证明在有颌动物中, 包括软骨鱼类和硬骨鱼类都已经分离出两种促性腺激素^[4], 命名为 GtH I 和 GTH II, 分别与哺乳类的 FSH 和 LH 相似。GtH I 和 GtH II 都由 α -亚基和 β -亚基组成, GtH I 和 GtH II 的 α -亚基氨基酸组成相同,

而 GtH I 和 GtH II 的 β -亚基则明显不同, 它们之间大约只有 31% 左右的氨基酸序列相同, 和哺乳类一样, 鱼类也是 β -亚基起生物学特异性作用。

目前研究 GTH 的方法主要是放射免疫测定法, 其需要的 GTH 标准品必需从所要研究鱼类的大量脑垂体中提取, 因此对于濒危珍贵物种的研究就受到限制。随着分子生物学研究的发展, 运用基因工程技术获得重组的 GTH 可以突破从脑垂体纯化的限制, 拓宽了研究途径。

本文利用基因工程技术, 分别构建了史氏鲟 2 种 GTH β 亚基的原核表达质粒, 并进行了诱导表达, 同时验证了表达产物的免疫活性, 为利用 GTH 重组蛋白制备抗体, 建立鲟鱼 GtH 的免疫测定方法以及深入研究它们的功能打下基础。

1 材 料

1.1 质粒和菌株

克隆质粒 pGEM-T easy Vector System 为 Promega 公司产品; 表达载体 pET-22b (+) 是 Novagen 公司产品, C 端带有 6 个组氨酸加尾便于重组蛋白纯化, T7lac 启动子, 氨苄抗性 (AmpR)。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 为本实验室保存。

* 收稿日期: 2007-05-24

基金项目: 国家科技部十五 863 现代农业技术主题基金资助项目 (2001AA243061, 2004AA243060); 北京市科学技术委员会资助项目 (954830400)

作者简介: 胡红霞 (1972 年生), 女, 博士; 通讯联系人: 林浩然; E-mail: lssllhr@mail.sysu.edu.cn

1.2 试剂和药品

高保真酶 KOD-Plus 购自 TOYOBO 公司, 限制性内切酶 *Nde* I, *Xho* I 购自 Takara 公司, T4-DNA 连接酶购自 MBI 公司; 胶回收试剂盒 (EZNA Gel Extraction Kit), 质粒纯化试剂盒 (EZNA Plasmid Kit) 为 Omega 公司产品, 6-His 单抗为 Novagen 公司产品, Histidine-tagged protein 纯化试剂盒 His-Trap™ Kit 购自 Amersham Pharmacia 公司。PCR 引物合成及测序由上海博亚公司合成, 羊抗小鼠和羊抗兔 IgG 血清和 NBT/BCIP 染色试剂盒购于华美生物工程公司。鲟鱼 GTH 纯品由俄罗斯发育生物研究所 Goncharov 教授惠赠, 兔抗鲟鱼 GTH 血清由中科院发育所制备。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 根据已知的史氏鲟 GTH I & II 的 β 亚基的可读编码框 (ORF) cDNA 序列^[5], 以两个基因 ORF 两端各 20 bp 左右为特异性引物来构建模板质粒。用 DNASTAR 软件分析 GtH I & II 的 β 亚基成熟肽 cDNA 序列中的限制性内切酶位点并筛选表达载体上的多克隆位点, 选用 *Nde* I (N 端) 和 *Xho* I (C 端) 2 个酶切位点, 在 2 个序列成熟肽两端分别设计构建表达载体的引物, 包括基因特异性引物、酶切位点以及 3 个保护碱基, 序列如下 (下划线部分为保护碱基, 阴影部分为酶切位点)。

GtH I - ExF: 5 - CGC CAT ATC AGC TGT GCC CTG GAG AAC -3

GtH I - ExR: 5 - CCG CTC GAG GTC CTC CTG GCT GAA GCA -3

GtH II - ExF: 5 - GGC CAT ATC CTG CGC CTG TGT GAG CCG -3

GtH II - ExR: 5 - CTA CTC GAG GTA GTT CTG TAT GGC GAG C -3

1.3.2 重组质粒的构建 模板质粒的构建: 以脑垂体总 RNA 的反转录产物为模板, 以 2 个 GTH β 亚基 ORF 框两端特异性引物进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C 预变性 4 min; 以下 30 个循环: 94 °C 变性 30 s; 60 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 40 s; 最后 72 °C 延伸 10 min; 取少量 PCR 产物进行琼脂糖胶电泳分析, 胶回收目的片段后连接到 T 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选的阳性克隆再进行 PCR 鉴定, GTH I β 和 GTH II β 各挑选两个阳性克隆的质粒测序。

表达质粒的构建: 以连接到 T 载体的 GTH I β 和 GTH II β 阳性质粒为模板, 用引物 GtH I - ExF 和 GtH I - ExR 以及 GtH II - ExF 和 GtH II - ExR

进行 PCR 扩增, 产物及原载体 pET22 - b (+) 分别用 *Nde* I, *Xho* I 进行双酶切, 酶切产物胶回收后在 T4 DNA 连接酶作用下将酶切片段与酶切载体进行连接。产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 携带阳性质粒的克隆 pET22b - GTH1 和 pET22b - GTH2 经 PCR 鉴定和酶切鉴定后测序。用 DNAssist 软件比对重组质粒测序结果与原基因的可读编码序列, 确认表达蛋白序列。

1.3.3 重组蛋白的表达 将构建好的表达质粒 pET22b - GTH1 和 pET22b - GTH2 分别转化感受态 BL21 (DE3), 挑单克隆在 LB (Amp +) 液体培养基 220 r/min, 37 °C 培养 10 ~ 12 h, PCR 鉴定后保存阳性克隆菌株。1% 稀释到新鲜液体培养基中继续培养, 待 A_{600} 达到 0.6 ~ 1, 加 1 mmol/L IPTG 在 37 °C 诱导 4 h, 收集菌液, 用 SDS - PAGE 检测表达情况; 用抗 6 - His 小鼠单抗和鲟鱼 GTH 兔抗血清分别为一抗, HRP 标记的羊抗小鼠和羊抗兔 IgG 分别为二抗, 进行 western - blot 检测目标蛋白。GtH I β 在 25 °C 和 37 °C 分别诱导, 25 °C 进行了时间梯度诱导表达。

2 结果

2.1 PCR 鉴定模板质粒阳性克隆

用 2 个基因 ORF 框两端的特异性引物对连接到 T 载体的模板质粒进行 PCR 鉴定, 结果显示 GTH I β 为 380 bp 左右, GTH II β 基因为 400 bp 左右 (图 1), 与各自的可读编码框序列 (分别为 384 bp 和 408 bp) 大小一致, 各挑选 2 个阳性质粒测序。

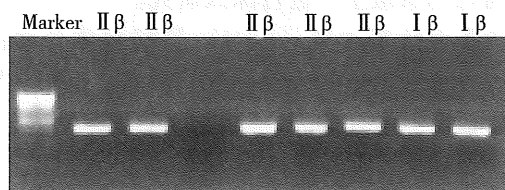


图 1 PCR 检测连接到 T 载体 GTH I β 和 GTH II β 阳性克隆
Fig. 1 Checking the positive GTH I β and GTH II β clone inserted T-easy vector by PCR

2.2 PCR 扩增插入表达载体的基因片段

以连接到 T 载体的 2 个基因可读编码框序列为模板, 用引物 GtH I - ExF 和 GtH I - ExR 以及 GtH II - ExF 和 GtH II - ExR 进行 PCR 扩增, 2 个基因都得到单一目的条带, GTH I - β 目的片段 336 bp, GTH II - β 为 354 bp, 成功扩增得到用以构建表达载体的包括酶切位点合保护碱基的 2 个基

因成熟肽序列 (图2), 胶回收后进行酶切和连接反应。



图2 PCR 扩增插入片段

Fig. 2 PCR amplification of insert fragment

2.3 表达质粒的测序结果比对分析

GtH I β 亚基开放阅读框为 384 bp, 编码 128 个氨基酸, 第 1-20 个氨基酸为信号肽, 第 21-128 个氨基酸为成熟肽。所构建的表达载体与 GtH I β 亚基成熟肽比对有一个碱基有差异, 但编码的氨基酸完全一致, 因此不影响蛋白的正确表达。

GtH II - β 亚基开放阅读框为 408 bp, 编码 136 个氨基酸, 第 1-21 个氨基酸为信号肽, 第 22-136 个氨基酸为成熟肽。所构建的表达载体测序结果推导的氨基酸序列与 GtH II - β 亚基可读编码序列比对, 成熟肽完全一致, 构建载体成功。

2.4 GtH I & II - β 重组表达质粒在 BL21 大肠杆菌中的表达

2.4.1 GtH I & II - β 重组表达蛋白检测及 Western-Blot 验证 SDS-PAGE 检测表达蛋白显示诱导产物 GtH I β 和 GtH II β 均能在预期大小处出现一特异条带: GtH I β 大约 14 000, GtH II β 大约 15 000。Western-Blot 验证结果可见 6-His 单抗和兔抗 GtH 多克隆抗体杂交条带与重组蛋白的目的条带的大小一致; 只是多克隆抗体由于没有纯化, 因此背景较深 (图3), 说明重组蛋白表达正确, 且与天然蛋白具有同样的免疫活性。

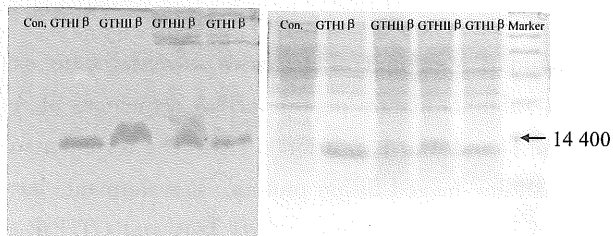


图3 重组 GtH β SDS-PAGE 电泳 (右) 及 Western-Blot 检测 (左) 结果

Fig. 3 Detection of recombinant GtH β -subunits by SDS-PAGE (right) and western-blot (left)

2.4.2 GtH I - β 不同温度诱导表达 GtH I - β 表达菌株在 LB 液体中培养到 A_{600} 达到 0.6~1 之间

时加入 1 mmol/L 的 IPTG, 在 25 $^{\circ}$ C 分别诱导 2, 4, 6, 8, 10 h, 收菌后 SDS-PAGE 检测表达。结果显示 2 h 目的蛋白就有明显的表达, 目的片段大约 14 000, 6 h 后随着时间增加表达量不再增加。低温下诱导 GtH I 的表达 2~8 h 内随时间延长表达量增加, 超过 8 h 略有抑制。但是比 37 $^{\circ}$ C 诱导最大表达量略低 (见图4)。

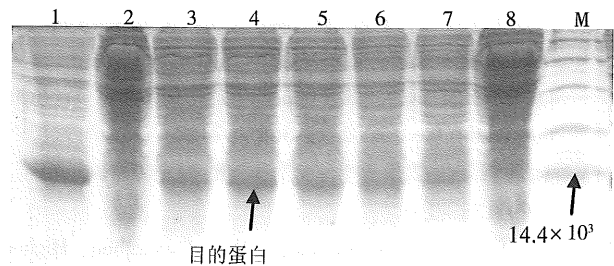


图4 重组 GtH I β 的诱导表达

Fig. 4 Inducing expression of recombinant GtH I β

1: 37 $^{\circ}$ C 6 h; 2: 37 $^{\circ}$ C 阴性对照; 3-7: 25 $^{\circ}$ C 诱导时间 10, 8, 6, 4, 2 h; 8: 25 $^{\circ}$ C 阴性对照; M: 蛋白相对分子质量标记

3 讨论

大肠杆菌表达系统是目前最常用的外源蛋白表达系统之一, 但是不能对表达蛋白进行糖基化修饰。促性腺激素 (GtH) 属于糖蛋白激素家族, 史氏鲟 GtH I β 含有 2 个 N-糖基化位点, GtH II β 含有 1 个 N-糖基化位点^[5]。研究表明糖基化修饰对其与促性腺激素类受体的作用不是必需的, 事实上去除糖基化的促性腺激素与受体的亲和力还略高, 然而在信号传导方面的作用显著下降^[6]。对促性腺激素类三维结构研究发现单体形成二聚体时糖类物质并不影响蛋白质骨架结构^[7]。大肠杆菌表达的促性腺激素类都表现出较高的免疫活性^[6,8-9], 甚至包涵体蛋白经复性后还显示有生物活性^[8]。没有糖基化的 hCG α 亚基能够与 hCG β 亚基形成二聚体^[6]。可见, 原核表达的促性腺激素虽然没有糖基化的修饰, 但仍有广泛的应用价值。

本文选用原核表达载体 pET-22b (+) 成功地构建了 GtH I 以及 GtH II β 成熟肽的表达载体, Western-Blot 验证表明系统能够正确表达目的蛋白, 且重组蛋白有免疫活性。

本研究为通过遗传方法获得鲟鱼 2 种 GtH 的重组蛋白, 并分别建立其免疫测定方法奠定了基础。鲟形目鱼类 GtH β 亚基的保守性较高, 氨基酸序列同源性在 90% 以上^[5], 因此, 本研究得到的

史氏鲟 GTH β 亚基重组蛋白, 完全可以广泛应用于其它鲟形目鱼类 GTH 的研究。

参考文献:

- [1] DOROSHOV S I, MOBERG G P, EENENNAAM J P, et al. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus* [J]. Environmental Biology of Fishes, 1997, 48: 265 - 278.
- [2] GONCHAROV B F. In vitro approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: A review of fundamental and applied aspects [J]. Journal of Application Ichthyology, 2002, 18: 368 - 374.
- [3] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 高等教育出版社, 1999: 158 - 165.
LIN Haoran. Fish Physiology [M]. Guangzhou: Higher Education Press, 1999: 158 - 165.
- [4] QUERAT B, TONNERRE - DONCARLI C, GENIES F, et al. Duality of gonadotropins in gnathostomes [J]. General and Comparative Endocrinology, 2001, 124: 308 - 314.
- [5] 胡红霞, 张勇, 刘晓春, 等. 史氏鲟两种促性腺激素 β 亚基 cDNA 克隆及序列进化分析 [J]. 动物学报, 2006, 52(2): 362 - 375.
HU Hongxia, ZHANG Yong, LIU Xiaochun, et al. cDNA cloning, sequences and phylogenetic analysis of two gonadotropins β subunits of Amur sturgeon (*Acipenser schrenkii*) [J]. Acta Zoologica Sinica, 2006, 52(2): 362 - 375.
- [6] REN PEIFENG, SAIRAM M R, YARNEY T A. Bacterial expression of human chorionic gonadotropin α subunit: studies on refolding, dimer assembly and interaction with two different β subunits [J]. Mol Cell Endocrinol, 1995, 113: 39 - 51.
- [7] LUSTBADER J W, POLLAK S, LABEL L, et al. Three dimensional structures of gonadotropins [J]. Mol Cell Endocrinol, 1996, 125: 21 - 31.
- [8] 金东华, 诸葛洪祥, 钱峰, 等. 人绒毛膜促性腺激素 α 亚基 cDNA 克隆、表达及纯化 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2003, 23(5): 511 - 514.
JIN Donghua, ZHUGE Hongxiang, QIAN Feng, et al. Cloning, expression and purification of the cDNA for the human chorionic gonadotropin subunit α [J]. Suzhou Univ J Medi Sci, 2003, 3(5): 511 - 514.
- [9] 张乐鸣, 刘东海, 董虹, 等. 人绒毛膜促性腺激素 β 亚基在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16: 415 - 417.
ZHANG Leming, LIU Donghai, DONG Hong, et al. Expression in *E. coli* of human chorionic gonadotropin subunit β cDNA [J]. J Chinese Immun, 2000, 16: 415 - 417.

Expression of Two Gonadotropin β - subunits of *Acipenser schrenkii* in *E. coli*

HU Hong-xia^{1,2}, BEI Jin-xin¹, LIU Xiao-chun¹, ZHANG Yong¹, LIN Hao-ran¹

(1. 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;

2. National Engineering Research Center for Freshwater Fisheries (Beijing) and Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

Abstract: Using the genetic engineering method, two gonadotropin β - subunit of *Acipenser schrenkii* were expressed in *E. coli*. Two cDNA Sequences of gonadotropin (GTH) β -subunits mature peptide cDNA sequences of Amur sturgeon were inserted into pET - 22b (+) vector, using *Nde* I and *Xho* I restriction site. The recombinant plasmids of two GTH β -subunits were constructed as C-terminal histidine-tagged fusion protein. Transformants harboring expression vectors were induced in *E. coli* strain BL21 (DE3), the recombinant GtH I - β and GtH II - β were about 14 000 and 15 000 respectively. The results of SDS-PAGE and western-blotting with the McAb of 6-histidine showed that the recombinant protein had correct molecular weight, just as expected. They also showed high immunological activities through western-blotting with polyclonal antibody of purified sturgeon GTH. GtH I β recombinant protein had obvious expression in 2 hours. The quantity of induced protein had no significant increase after 6 hours. The combined protein will contribute to develop a RIA method for detection of *Acipenser*.

Key words: *Acipenser schrenkii*; gonadotropin; β -subunit; proteins; genetic engineering