

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 生长激素体外重组表达及活性分析*

柳学周¹ 刘芝亮^{1,2} 徐永江¹ 王妍妍¹ 李春广³

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 绍兴市鸿港农业开发有限公司 绍兴 312000)

提要 根据半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)生长激素(GH)基因的 cDNA 全长序列设计引物克隆得到其全长 552 个碱基成熟肽序列。利用 RT-PCR 方法将扩增片段克隆到原核表达载体 pET-28a 上, 实现了 GH 成熟肽在大肠杆菌 BL21(DE3)中的融合表达。融合蛋白分子量为 26 kDa, 在 IPTG 诱导 4h 时目的蛋白表达量最高, 占细菌总蛋白的 41.5%, 主要以包涵体形式存在。Western-blotting 分析表明 GH 融合蛋白可特异性地被 6 × His 抗体识别。诱导表达后的菌液沉淀经纯化和复性后, 获得大小为 26 kDa 的纯化 GH 融合蛋白。以 ELISA 方法检测纯化后的 GH 融合蛋白显示其具有免疫学活性。本研究为认识半滑舌鳎生长轴的调控机制提供了基础资料。

关键词 半滑舌鳎; GH; 原核表达; 活性分析

中图分类号 Q953 **doi:** 10.11693/hyhz20131100167

生长激素(growth hormone, GH)是一种具有广泛生理功能的生长调节素, 分子量为 21—22 kDa, 对鱼类的生长发育具有重要调控作用(Chen *et al.*, 1994; Yowe *et al.*, 1995; Benedet *et al.*, 2005)。鱼类 GH 作为新陈代谢的调控子元件, 能够有效地促进脂肪更多分解为能源, 使吸收的氨基酸更多用于生长(Yowe *et al.*, 1995), 同时可提高鱼类的食欲和饵料中蛋白质的转化效率(Silverstein *et al.*, 2000), 促进肝糖原的消耗(Leung *et al.*, 1991)和蛋白质的合成(Markert *et al.*, 1977; Johnsson *et al.*, 1994)。GH 在鱼体内多通路多层次上的综合调节, 有效地促进了鱼体的生长发育(Bjornsson, 1997)。研究表明, 体外重组 GH 与鱼体内天然 GH 具有相同的生物活性, 给鱼类注射或投喂天然或重组 GH 可使受体鱼食欲增强, 饵料的转化效率提高, 鱼体生长加快, 养殖周期缩短, 实现商品鱼尽快上市, 从而大大提高养殖效益(Mclean *et al.*, 1990; 简清等, 1999; 马进等, 2001; 李晶等, 2004; 孙颖等, 2006)。外源 GH 的生长促进作用可能通过鱼类后肠

上皮细胞的泡饮作用吸收完整的外源 GH 蛋白, 从而使得具有免疫学活性和生物学活性的生长激素可以进入鱼类血液中, 从而促进鱼体生长(简清等, 1999; 孙颖等, 2006)。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther), 属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*), 为东北亚特有的名贵冷温性底栖大型鲽形目鱼类, 是一种理想的近海增养殖对象(邓景耀等, 1988), 目前已成为我国三大鲽类主导养殖品种之一。半滑舌鳎具有生长的性别二态性, 即雌性的生长速度远大于雄性, 因而养殖雌性苗种更具有经济性。但目前对半滑舌鳎生长调控机制的认识不足, 不利于建立其养殖生长调控技术。鉴于 GH 在鱼类生长调控中的重要作用及其在雌雄个体生长过程中的差异表达特性(Ma *et al.*, 2011), 本研究构建了半滑舌鳎 GH 原核表达载体系统, 获得了具有免疫和生物活性的重组半滑舌鳎 GH 蛋白, 为从蛋白水平深入认识半滑舌鳎生长调控机制以及开发实用的半滑舌鳎生

*国家鲆鲽类现代产业技术体系项目, CARS-50 号; 国家 863 计划项目, 2012AA10A413 号; 中央级公益性事业单位基本科研业务费项目, 20603022012022 号; 山东省自然科学基金项目, ZR2012CQ025 号。柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-11-04, 收修改稿日期: 2014-02-26

长调控技术提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

试验用半滑舌鲷 5 尾(全长 39—48cm, 体重 750—1120g)取自青岛忠海水产有限公司(青岛), 实验鱼运回实验室后, 以 MS222 (280mg/L)麻醉处死, 迅速取其垂体和肝脏组织保存于液氮中(−196℃)用于总 RNA 提取。

1.2 GH 成熟肽的克隆

利用 RNAiso plus (TaKaRa)从垂体组织中提取总 RNA, 检验浓度和纯度, 在 M-MLV 反转录酶(TaKaRa)的作用下合成第一链 cDNA, 保存于−20℃ 备用。根据已知半滑舌鲷 GH 全长序列(GenBank Accession No.: FJ608663)设计特异性引物, 引物序列见表 1。

表 1 半滑舌鲷 GH 成熟肽扩增用特异性引物
Tab.1 Primers for matured peptide of GH gene from *C. semilaevis*

引物名称	引物序列(5'—3')
P1: Forward primer	CCC <u>AAGCTT</u> GCATGCAGCCGGTTATAG ACCAGCG
P2: Reverse primer	CCG <u>CTCGAG</u> TTACAGGGTACAGTTAG CTTCTGG

在引物 P1 和 P2 的 5'端分别加入了 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点(方框标注), 同时将下游引物 P2 终止密码子 TAG 更换为强终止密码子 TTA(阴影部分)。为保证重组蛋白翻译的氨基酸序列的正确性, 在上游引物 P1 中还额外添加了两个碱基(下划线标注)。利用引物 P1 和 P2, 以垂体 cDNA 为模板 PCR 扩增得到 GH 成熟肽, PCR 条件: 94℃ 5min 变性, 然后(94℃ 30s, 61℃ 30s, 72℃ 50s) 34 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min, 将成熟肽片段连接到 pEASY-T1 载体上, 挑选阳性克隆送往北京华大基因测序验证。

1.3 原核表达载体的构建

选择测序正确的菌液进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后将所得条带进行切胶回收纯化, 分别对回收产物和 pET-28a 质粒进行双酶切, 得到具有相同黏性末端的 GH 和 pET-28a 基因片段。

将双酶切后的 GH 连接到线性化的 pET-28a 上, 得到重组质粒 GH/pET28a, 转化大肠杆菌 DH5 α (Invitrogen), 菌液 PCR 验证并测序。提取测序正确的重组质粒, 并制备含 GH/pET28a 质粒的表达菌株 BL21(DE3)。

1.4 重组 GH/pET28a 质粒在大肠杆菌中的诱导表达

将含GH/pET28a质粒的表达菌株BL21(DE3), 在

含卡那霉素的 LB 培养基中 37℃ 震荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.7, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 4 h, 诱导结束后, 8000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤并重悬菌体, 取 20 μ L 重悬后菌体加 5 μ L 5 × SDS-PAGE 上样 Buffer, 沸水浴 5 min, 离心去杂质, SDS-PAGE 电泳检测是否有 GH 融合蛋白表达。

将重悬后菌体在 37℃ 扩大培养, 至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 相同条件下继续培养, 分别在诱导 0h、1h、2h、3h、4h、6h 后各取 2mL 菌液, SDS-PAGE 电泳检测, SigmaScan pro 5 软件分析不同诱导时间下融合蛋白表达率。另取部分重组菌分别在 18℃、28℃ 和 37℃ 条件下诱导培养 4 h, 分析温度对融合蛋白表达的影响。

1.5 GH 融合蛋白 Western-blotting 验证

收集诱导 4 h 的菌体沉淀和对照菌沉淀, 经 SDS-PAGE 电泳后, 利用半干电转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% BSA 封闭, 室温下一抗和二抗分别抚育 2 h, 所用一抗和二抗分别为 6 × His Monoclonal Antibody (Clontech)和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG, HRP-DAB 显色(Tiagen Biotech Co., Ltd), 数码相机拍照。

1.6 GH 融合蛋白纯化和复性

将 37℃ 条件下 IPTG (1 mmol/L)诱导表达 4 h 的重组菌, 8000 r/min 4℃ 离心 10 min, PBS 洗涤沉淀, 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。破碎后的沉淀用包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 2 mol/L Urea, 1% Triton X-100)洗涤 2—3 次, 洗涤后的包涵体溶于包涵体裂解液(6 mol/L guanidine HCl pH 6.5, 0.4 mol/L NaH₂PO₄, 0.4 mol/L Na₂HPO₄, 0.5 mol/L NaCl) 4℃ 过夜变性, 变性后的包涵体 12000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 上清先后用 0.8 μ m 和 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 然后 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱(TaKaRa)分离纯化融合蛋白。

分离后的融合蛋白 SDS-PAGE 电泳检测后装入到透析袋中, 分别用 8 mol/L → 6 mol/L → 4 mol/L → 2 mol/L 尿素梯度复性液和 PBS 充分透析复性, 用 10 kDa 超滤管(Millipore)进行超滤浓缩, SDS-PAGE 电泳检测, −80℃ 超低温冰箱保存。

1.7 GH 融合蛋白的免疫活性测定

将纯化并复性后的 GH 融合蛋白复溶, Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒(Thermo Scientific Co., Ltd)测定重组蛋白浓度。根据 BCA 蛋白定量分析试剂盒

的测定结果将 GH 融合蛋白用 ddH₂O 稀释 10⁶ 倍, 使稀释后的估测浓度在 Fish GH ELISA Kit (CUSABIO 公司, 上海) 检测范围之内, 采用竞争酶联免疫法检测 GH 含量, 按照 Fish GH ELISA Kit 说明书测定 GH 融合蛋白浓度。

1.8 GH 融合蛋白的生物活性检测

采用 MTT 法检测重组 GH 蛋白在细胞水平的生物活性。将纯化复性的重组蛋白过滤除菌待用。将生长状态良好的人乳腺癌细胞 MDA231 以 1×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板(每孔 200 μ L), 培养 24 h 后, 弃去培养基加入含不同浓度重组蛋白(0.49, 2, 4.9 和 49 μ g/mL) 的新鲜培养基, 并设空白对照组, 每组设 4 个平行, 继续培养 48 h 后, 弃上清, 每孔加入 90 μ L 新鲜培养液, 再加入 10 μ L MTT (Sigma) 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷(DMSO)摇床低速震荡 10 min, 使晶体物充分溶解, 酶标检测仪 570 nm 波长处读取各样品的光密度值。细胞增殖率(GSR)计算方法为: $GSR (\%control) = A_{sample} / A_{control} \times 100$, A_{sample} 为加入重组蛋白组, $A_{control}$ 为未加重重组蛋白组。

1.9 数据处理

本研究所有数据采用平均值 $\pm$ 标准差(Means $\pm$ S.D.)表示, 以 SPSS 17.0 软件进行单因素方差(ANOVA)分析, 设置差异显著性水平 $P=0.05$, 当 $P<0.05$ 时视为差异显著。

2 结果

2.1 半滑舌鳎 GH 成熟肽的克隆

RT-PCR 扩增脑垂体 cDNA 后, PCR 产物经纯化、测序, 得到与 NCBI 上相一致的长 552bp 的半滑舌鳎 GH 成熟肽序列, 其编码 183 个氨基酸, 含四个半胱氨酸(Cys), 可形成两个二硫键, 且在成熟肽两端酶切位点加入正确, 可用于重组载体构建。

2.2 GH/PET28a 重组质粒的构建

将正确克隆的 GH 成熟肽序列插入到原核表达质粒 PET-28a 上, 得到重组质粒 GH/PET28a (图 1), GH/PET28a 重组质粒编码重组蛋白的序列(csGH)长 681bp, 在 T7 启动子的作用下, 由起始密码子 ATG 开始编码重组蛋白, 到终止密码子 TAA 停止, 所编码的 GH 融合蛋白 26 kDa, 等电点为 7.77, 由 227 个氨基酸组成, 其中包括 GH 成熟肽和 N 端的 6 $\times$ His 标签, 可进行诱导和蛋白纯化。

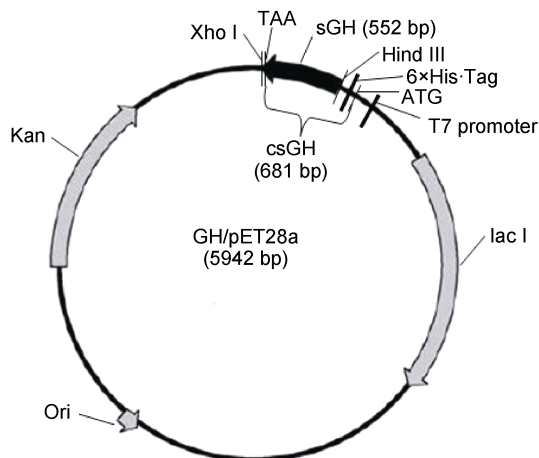


图 1 GH/pET28a 质粒的构建

Fig.1 Construction of the recombinant expression plasmid GH/pET28a

Kan: 卡那霉素抗性; lac I: lac 阻遏物; Ori: 复制起点; sGH: 半滑舌鳎成熟肽序列; csGH: 目的蛋白编码序列

2.3 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

将重组质粒 GH/PET28a 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3)进行诱导表达, 以未加诱导剂的重组菌为阴性对照。SDS-PAGE 电泳显示, 在 20.1 kDa 和 29 kDa 之间出现特异性条带, 分子大小为 26 kDa, 与预期结果一致(图 2), 说明 GH 融合蛋白成功表达。

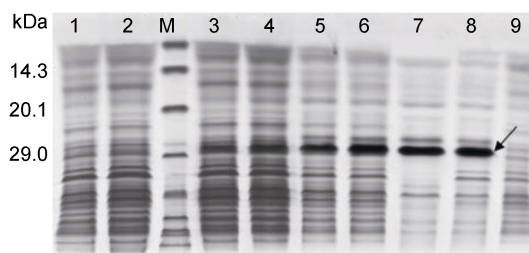


图 2 半滑舌鳎重组 GH/pET28a 表达产物 SDS-PAGE 分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis on GH/PET28a fusion protein of *C. semilaevis*

M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导 4h 的对照菌; 2—7 分别为: 诱导 0、1、2、3、4、6h 的重组菌; 8—9 分别为: 诱导 4h 后细菌裂解液沉淀和上清(箭头所指为 26 kDa 目的蛋白)

不同温度诱导条件下获得的 GH 融合蛋白表达量不同。由图 3 可知, 与 18 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C 相比, 37 $^{\circ}$ C 温度下蛋白表达量较高, 结果显示诱导 4 h 时 GH 融合蛋白表达量达到最大(图 2 和图 4), 占菌体总蛋白的 41.5%, 此后蛋白表达量并不随时间的延长而增加, 可知 GH 重组菌在 37 $^{\circ}$ C 条件下以 IPTG (1 mmol/L) 诱导 4 h GH 融合蛋白可达到最佳诱导效果。

2.4 IGF- 融合蛋白的 western-blotting 验证

采用 western-blotting 免疫印迹方法对诱导 4 h 的

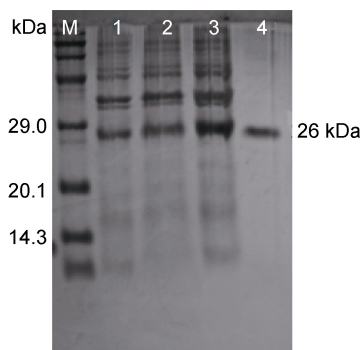


图3 不同温度下重组 GH/pET28a 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis on GH/PET28a fusion protein at different temperatures

M: 蛋白 Marker; 1—3 分别为: 18°C、28°C、37°C 诱导 4h 的重组 GH 蛋白; 4: 纯化后的 GH 融合蛋白

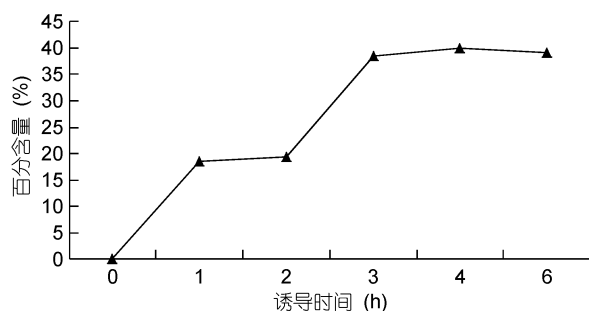


图4 不同诱导时间下 GH 融合蛋白的表达量

Fig.4 Expression percentage of GH fusion protein in different induction time

重组菌进行检测, DAB 显色后, PVDF 膜上在标记位置可见单一清晰印迹(图 5), 说明重组菌表达了融合蛋白, 且能特异性的被 6 × His 抗体识别, 验证了半滑舌鲷 GH 融合蛋白表达成功。



图5 GH 融合蛋白的 western-blotting 验证

Fig.5 Western-blotting analysis on recombinant IGF-I protein

2.5 GH 融合蛋白的 ELISA 测定

通过 Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒测得纯化后的 GH 融合蛋白浓度为 490 μg/mL, 将融合蛋白稀

释 10^6 倍后, 采用竞争酶联免疫法(ELISA)检测 GH 融合蛋白浓度, 结果显示重组 GH 融合蛋白可与鱼类生物素标记 GH 发生抗体竞争性反应, 测得稀释后重组 GH 融合蛋白浓度为 502 pg/mL, 与 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定结果基本一致, 可推断重组半滑舌鲷 GH 融合蛋白与其它鱼类 GH 具有相似的免疫活性。

2.6 GH 融合蛋白的生物活性检测

以 MTT 法来检测不同浓度的重组 GH 融合蛋白对 MDA231 乳腺癌细胞增殖的影响, 结果如图 6 所示。各浓度组重组 GH 均未见明显的细胞增殖效果, 自 2 μg/mL 开始, 重组 GH 对细胞生长具有一定的抑制作用, 而以 49 μg/mL 浓度组最为明显($P < 0.01$)。

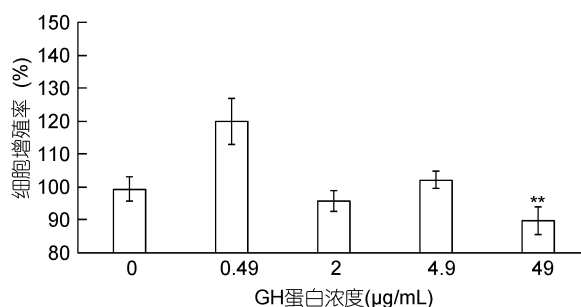


图6 重组 GH 融合蛋白生物活性分析

Fig.6 Bioactivity of recombinant GH protein of *C. semilaevis* GSR 用平均值 ± 标准差 (Means ± S.D.) 表示 ($n=4$); **表示与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

3 讨论

本研究选择了大肠杆菌 BL21(DE3)作为宿主菌, 大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、工艺简单、产量高和生产成本低等特点, 而且也是目前研究最成熟的表达体系, 大肠杆菌虽缺少蛋白翻译后的修饰加工机制, 但鱼类 GH 翻译后无需糖基化修饰, 而且只含有两个二硫键, 容易复性, 因此大肠杆菌是表达鱼类 GH 的理想载体。研究选用 pET-28a 为表达载体, 以 T7 RNA 聚合酶启动转录, 能转移识别 T7 强启动子, 具有比大肠杆菌 RNA 聚合酶高出数倍的转录效率。表达的蛋白为融合蛋白, N-末端含有 His-Tag 标签, 便于后期的分离纯化。

本研究构建的半滑舌鲷 GH/pET28a 重组质粒在原核表达载体 BL21(DE3)中成功表达出分子量约 26 kDa 的 GH 融合蛋白, 融合蛋白表达量较高, 占细菌总蛋白的 41.5%。马骞等(2012)使用 pET-32a 载体成功表达出了 GH 融合蛋白, 其在表达系统构建过程中未将 GH 基因信号肽部分切除, 所以表达的 GH 融

合多肽含有半滑舌鲷 GH 基因的完整 ORF 序列, 融合蛋白分子量约 40kDa, 表达量占细菌总蛋白的 37.6%, 但未开展融合蛋白纯化和活性检测工作。信号肽的存在对基因的原核表达存在一定的影响(龚婷等, 2009), 真核生物的信号肽在原核生物(如大肠杆菌)中表达时大部分不具有分泌功能, 而且始终与活性蛋白融合在一起, 影响活性蛋白的正确折叠与功能发挥, 因此本研究在构建半滑舌鲷 GH/pET28a 重组质粒时, 将 GH 基因 ORF 中的信号肽部分切除, 提高了表达水平, 将表达产物进行了纯化和复性, 并对纯化复性后的 GH 融合蛋白的活性进行了初步研究, 为进一步研究 GH 蛋白的作用和作用机理奠定了基础。

纯化和复性后的半滑舌鲷 GH 融合蛋白的 ELISA 测定结果显示其与鱼类 GH 具有相同的抗原活性, 表明体外重组表达的半滑舌鲷 GH 融合蛋白具有免疫活性。利用细胞增殖试验验证其生物学活性时, 发现重组半滑舌鲷 GH 蛋白对人乳腺癌细胞 MDA231 无增殖效果, 而在高浓度才有显著的细胞生长抑制效果, 因此无法断定其是否具有细胞水平的生物学活性, 也同时说明获得的 GH 融合蛋白的生长调控作用不是通过直接作用于细胞实现, 可能是通过旁分泌的途径进行。养殖生产实践中, 有关 GH 的促生长作用, 白俊杰等(1999)直接将基因重组的鲤鱼 GH 添加到饲料中投喂罗非鱼, 证实有明显的促生长作用, Jeh 等(1998)将通过大肠杆菌重组表达的牙鲆 GH 蛋白作为饲料添加剂投喂牙鲆幼苗, 促生长效果明显。因此, 今后本实验室将继续开展重组半滑舌鲷 GH 融合蛋白对半滑舌鲷幼鱼生长调控作用的相关实验, 以验证体外重组 GH 融合蛋白对半滑舌鲷的促生长效果。

原核表达系统中目的蛋白的表达量受多种因素影响, 如重组菌浓度、诱导温度、诱导时间和诱导剂浓度等, 本研究中对 GH 融合蛋白的最适诱导温度和诱导时间进行了探讨, 结果显示低温时可产生少量可溶性蛋白, 但融合蛋白含量较低, 纯化效果较差, 37°C 时蛋白表达量最大, 主要以包涵体形式存在, 虽然需要增加复性步骤, 但纯化过程较容易, 得到的融合蛋白较多, 为后续实验提供了条件。随着诱导时间的增加, 蛋白表达量逐渐增加, 到达 4 h 时达到最大, 再增加诱导时间蛋白表达量并不随之增加, 推测其原因可能有两个方面: 一方面 BL21(DE3)虽然为蛋白酶缺陷菌株, 诱导时间过长, 随着细菌的代谢产物增加, 插入的外源蛋白仍不可避免会遭受宿主的降

解, 从而不利于表达蛋白的收获; 另一方面可能胞体内不断积累的外源蛋白包涵体对宿主菌产生毒素效应, 从而限制了蛋白的积累。

实验条件下原核表达系统有很多优势, 如工艺简单、产量高、生产成本低等, 但将其应用与生产实践时就体现出很大的局限性, 如需进行蛋白纯化和生物活性恢复, 后续工作比较繁琐, 在大规模生产方面酵母表达系统更有优势, 因此半滑舌鲷 GH 真核表达系统的构建将成为后续实验的重点。本实验结果为半滑舌鲷 GH 重组蛋白在水产养殖中的应用奠定理论基础。

参 考 文 献

- 马 进, 白俊杰, 简 清等, 2001. 重组虹鳟生长激素酵母对罗非鱼的促生长作用研究. 大连水产学院学报, 16(3): 219—222
- 马 骞, 柳淑芳, 庄志猛等, 2012. 半滑舌鲷生长激素及其受体基因的原核表达. 中国水产科学, 19(6): 956—962
- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民等, 1988. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, (9): 10—18
- 白俊杰, 马 进, 简 清等, 1999. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)生长激素基因克隆及原核表达. 中国生物化学与分子生物学报, 15(3): 409—412
- 孙 颖, 林浩然, 2006. 基因重组草鱼生长激素(r-gGH)对草鱼鱼种生长的促进作用. 水产学报, 30(6): 740—746
- 李 晶, 沙长青, 杨成辉, 2004. 重组鲑鱼生长激素基因酵母对鲤鱼苗促生长作用研究. 中国饲料, (18): 30—33
- 龚 婷, 杨孝朴, 李银聚等, 2009. 鸡 IL-2 全基因和去信号肽基因的原核表达. 甘肃农业大学学报, 44(1): 11—14
- 简 清, 白俊杰, 1999. 饲料中添加重组鱼生长激素对罗非鱼鱼种的促生长作用研究. 淡水渔业, 29(3): 3—5
- Benedet S, Johansson V, Sweeney G *et al*, 2005. Cloning of two Atlantic salmon growth hormone receptor isoforms and in vitro ligand-binding response. Fish Physiol Biochem, 31(4): 315—329
- Bjornsson B T, 1997. The biology of salmon growth hormone: From daylight to dominance. Fish Physiol Biochem, 17(1—6): 9—24
- Chen T T, Marsh A, Shablott M *et al*, 1994. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes. Fish Physiology, 13: 179—209
- Jeh H S, Kim C H, Lee H K *et al*, 1998. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. J Biotechnol, 60(3): 183—193
- Johnsson J I, Bjornsson B T, 1994. Growth hormone increase growth rate, appetite and dominate in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Animal Behavior, 48(1): 177—186

- Leung T C, Nga T B, Woob N Y S, 1991. Metabolic effects of bovine growth hormone in the tilapia (*Oreochromis mossabicus*). *Com Biochem Physiol*, 99(4): 633—636
- Ma Q, Liu S F, Zhuang Z M *et al*, 2011. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide genes in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Genetics and Molecular Research*, 10(4): 3828—3846
- Markert J R, Higgs D A, Dye H M *et al*, 1977. Influence of bovine growth hormone on growth rate, appetite and food conversion of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed two diets of different composition. *Journal of Zoology*, 55(1): 74—83
- Mclean E, Meden A C, Donaldson E M, 1990. Intestinal absorption of growth hormone in fish. *Fish Biol*, 36: 489—496
- Silverstein J T, Wolters W R, Shimizu M *et al*, 2000. Bovine growth hormone treatment of channel catfish: strain and temperature effects on growth, plasma IGF-I levels, feed intake and efficiency and body composition. *Aquaculture*, 190(1—2): 77—88
- Yowe D L, Epping R J, 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene*, 162(2): 255—259

IN VITRO PROKARYOTIC RECOMBINANT EXPRESSION AND BIOACTIVITY ASSAY OF GROWTH HORMONE FROM *CYNOGLOSSUS SEMILAEVIS* G Ü N T H E R

LIU Xue-Zhou¹, LIU Zhi-Liang^{1,2}, XU Yong-Jiang¹, WANG Yan-Yan¹, LI Chun-Guang³

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, 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; 3. Shaoxing Honggang Agriculture Development Co., Ltd., Shaoxing 312000, China)

Abstract We isolated a mature peptide domain of growth hormone (GH) gene from pituitary of *Cynoglossus semilaevis* Günther. The matured peptide is 552base-pair long and composed of 183 amino acids residues. This matured peptide fragment was subcloned into a prokaryotic expression vector pET-28a and was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) plysS. SDS-PAGE analysis indicated that the obtained GH fusion protein expressed in the form of inclusion bodies in molecular weight of 26 kDa and maximally amounted to 41.5% of the whole protein in *E. coli* cell in 4 hours after being induced with IPTG. Western-blotting analysis indicated the fusion protein had the antigenicity to 6×His antibody. The IPTG-induced bacterial precipitation was denaturalized, purified, and annealed, and then the purified fusion protein in molecular weight of 26 kDa was obtained. ELISA detection of recombinant GH protein showed that the in vitro recombinant GH fusion protein has ideal antigen activity. The proliferation experiment showed that high-concentration recombinant GH protein could inhibit the proliferation of human breast cancer cells MDA231. Results from this study could be helpful for understanding the growth mechanisms of *C. semilaevis* Günther.

Key words *Cynoglossus semilaevis* Günther; growth hormone (GH); prokaryotic expression; bioactivity assay