

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00956

## 半滑舌鳎生长激素及其受体基因的原核表达

马骞, 柳淑芳, 庄志猛, 唐启升

山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

**摘要:** 根据已克隆的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)生长激素(GH)基因和生长激素受体 (GHR-)基因的 cDNA 序列信息设计引物, 用于扩增半滑舌鳎 GH、GHR- 基因序列。随后, 分别利用表达载体 pET-32a 和 pGEX-6P-1 成功构建了包含半滑舌鳎 GH、GHR- 基因 ORF 全序列及不同 ORF 片段的 6 个重组质粒, 并将获得的重组质粒在表达宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中, 用 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳结果显示: 重组 GH 的 pET-32a-CSGH 质粒在 40 kD 处有特异性的蛋白条带, 重组 GHR- 胞内区的 pGEX-6P-1-CSGHR1-2 质粒在 70 kD 处发现诱导的蛋白条带, 其表达量分别占细胞蛋白总量的 37.6 %和 20.2%; 而构建的 pGEX-6P-1-CSGH 重组质粒和含有 GHR- 基因跨膜区的重组质粒(pET-32a-CSGHR1-1、pET-32a-CSGHR1-2 和 pGEX-6P-1-CSGHR1-1)均未获得表达产物。由此可见, 半滑舌鳎 GHR- 基因的跨膜区可能影响其在大肠杆菌中的表达。研究结果为实现半滑舌鳎 GH、GHR- 制剂的开发及应用于养殖生产实践奠定基础。

**关键词:** 半滑舌鳎; 生长激素基因; 生长激素受体 基因; 原核表达

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-0956-07

鱼类生长激素(GH)是一种由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的非糖基化单链多肽类激素, 分子量为 21~22 kD<sup>[1]</sup>。GH 具有调节鱼体生长发育、促进蛋白质合成及脂肪代谢<sup>[2]</sup>、增加鱼类食欲和提高食物转化效率<sup>[3]</sup>等生理功能, 对鱼类的生长和发育有重要作用。在鱼类中, Sekine 等<sup>[4]</sup>首次在鲑(*Oncorhynchus keta*)中实现了 GH 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的表达。随后, 许多鱼类的重组 GH 也相继在大肠杆菌中获得表达, 研究对象包括牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[5]</sup>、金头鲷(*Sparus aurata*)<sup>[6]</sup>及青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)<sup>[7]</sup>等, 从而使大批量生产鱼类 GH 并将其应用于产业化养殖成为可能。更有研究表明, 重组 GH 能被鱼类消化道完整吸收而进入血液循环, 并具有显著的促进生长活性<sup>[8-10]</sup>, 而且外源 GH 在鱼体内很

快就会分解, 不会在鱼体内累积<sup>[11]</sup>。因而, 利用基因工程表达的重组鱼生长激素通过注射、浸泡或投喂等方式促进鱼体生长, 在水产养殖业中具有重大应用价值。

GH 在组织和细胞水平生理作用的发挥, 是通过与靶细胞表面的生长激素受体(GHR)结合, 将信号传入细胞内从而产生一系列生理效应。有研究表明, 鱼类禁食后肝脏 GHR 的数量减少, GH 与 GHR 的结合率下降, 从而降低 GH 的促生长作用, 引起使鱼类生长减慢<sup>[12-13]</sup>。GHR 在硬骨鱼类中存在两种类型<sup>[12, 14]</sup>, 一种具有 6 到 7 个胞外的半胱氨酸残基, 可以代表大多数已报道的鱼类 GHR, 即 GHR- ; 而 GHR- 在胞外氨基酸序列中仅存在 5 个半胱氨酸残基。迄今, 国内外学者针对鱼类 GHR 开展了大量研究, 主要集中在

收稿日期: 2012-04-27; 修订日期: 2012-08-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871913, 31201981); 山东省泰山学者工程专项(2009.03—2014.02); 山东省自主创新成果转化重大专项(2009ZHXX1A1201).

作者简介: 马骞(1983-), 女, 博士, 从事渔业资源分子生态学研究. E-mail: maqian@ysfri.ac.cn

通信作者: 柳淑芳, 副研究员, 从事渔业资源分子生态学研究. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

GHR- 基因的序列克隆、多态性及 mRNA 表达分析等方面。但由于 GHR 具有复杂的跨膜区等蛋白结构, 至今尚未见有关鱼类重组 GHR 原核表达的相关报道。因此, 开展半滑舌鲷 GHR 基因的原核表达研究, 将为进一步研究鱼类 GH、GHR 的生物学功能及应用奠定基础。

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873), 属鲈形目 (Pleuronectiformes)、舌鲷科 (Cynoglossidae)、舌鲷属 (*Cynoglossus*), 是中国大陆重要的名贵海水鱼类和理想的近海增养殖对象<sup>[15]</sup>。近年来, 半滑舌鲷规模化人工繁育技术日趋完善<sup>[16]</sup>, 但有关半滑舌鲷促生长制剂的开发尚属空白。本研究对半滑舌鲷生长激素及其受体基因的原核表达研究进行初步探讨, 期望对半滑舌鲷特异性 GH、GHR- 制剂的开发并应用于养殖生产实践提供科学依据; 同时, 获得的重组蛋白将为开展半滑舌鲷 GH、GHR- 的蛋白质功能和生物活性检测分析奠定前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

3 龄半滑舌鲷取自山东莱州明波水产养殖有限公司, 取其脑垂体和肝脏组织用于总 RNA 提取。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成** 将半滑舌鲷的脑垂体和肝脏组织在液氮中研磨后, 利用

Trizol 法 (Invitrogen) 提取总 RNA。检测其浓度和纯度, 以提取的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript RTase 试剂盒 (Takara) 合成第一链 cDNA。

**1.2.2 引物设计与 RT-PCR** 根据半滑舌鲷 GH (HQ334196) 和 GHR- (HQ334200) 基因的 ORF 序列, 参照 pET-32a 载体上多克隆位点的排列, 分别选取合适的酶切位点 *EcoR* 和 *Xho*、*EcoRV* 和 *Sal*, 设计用于扩增 GH 和 GHR- 基因的引物 GH-EXP-F1/R1、GHR1-EXP-F1/R1 和 GHR1-EXP-F2/R2 (表 1)。3 对引物分别用于扩增 GH 基因 ORF 全长、GHR- 基因 ORF 全长及 GHR- 基因部分序列 (胞外区及跨膜区)。此外, 参照 pGEX-6P-1 载体上多克隆位点的排列, 选取合适的酶切位点 *Hind* 和 *Sac*, 设计一对引物 GH-EXP-F2/R2 用于扩增 GH 基因 ORF 全长; 选取合适的酶切位点 *EcoR* 和 *Xho*, 设计 2 对特异性引物 GHR1-EXP-F3/R3 和 GHR1-EXP-F4/R4, 分别用于扩增 GHR- 基因胞外区跨膜区部分序列及胞内区部分序列。

**1.2.3 GH、GHR- I 基因重组质粒的构建** 利用上述 6 对引物, 以半滑舌鲷第一链 cDNA 为模板, 分别扩增半滑舌鲷 GH、GHR- 基因片段。随后, 将目的片段与 pMD18-T simple 载体连接, 获得的重组质粒经菌落 PCR 检测后, 连同 pET-32a 和 pGEX-6P-1 质粒共同进行双酶切。在 T4 连接酶作用下将目的片段定向克隆入表达载体, 转化感受

表 1 本研究所使用的引物序列  
Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequences (5' - 3')	扩增片段 amplification target	片段长度/bp fragment size	表达载体 vector	重组质粒 recombinant plasmid
1 GH-EXP-F1 GH-EXP-R1	5'-GCCGATATCATGGACAAACTTGTTTTACT-3' 5'-CGGCTCGAGCTACAGGGTACAGTTAGCTT-3'	GH 基因 ORF 全长	603	pET-32a	pET-32a-CSGH
2 GH-EXP-F2 GH-EXP-R2	5'-CCGAAGCTTCGTCAGAATCAGAACCAAACCAA-3' 5'-GCCGAGCTCGATCGTCTCTTCATTGTGT-3'	GH 基因 ORF 全长	653	pGEX-6P-1	pGEX-6P-1-CSGH
3 GHR1-EXP-F1 GHR1-EXP-R1	5'-GCCGATATCATGGCTATCCACTCACTCTC-3' 5'-GACGTCGACTCATGGTGAGAGATTCCCA-3'	GHR- I 基因 ORF 全长	1902	pET-32a	pET-32a-CSGHR1-1
4 GHR1-EXP-F2 GHR1-EXP-R2	5'-GCCGATATCATGGCTATCCACTCACTCTC-3' 5'-GACGTCGACTGTGCTGCTGGGAGACGATA-3'	GHR- I 基因 胞外区及跨膜区	842	pET-32a	pET-32a-CSGHR1-2
5 GHR1-EXP-F3 GHR1-EXP-R3	5'-CCGAATTCACCAGCGTGACCAAAGAGAT-3' 5'-GACCTCGAGTGTGCTGCTGGGAGACGATAA-3'	GHR- I 基因 胞外区及跨膜区	862	pGEX-6P-1	pGEX-6P-1-CSGHR1-1
6 GHR1-EXP-F4 GHR1-EXP-R4	5'-ACAGAATTCTCCAGCAGCACAGATTCAT-3' 5'-GACCTCGAGCCAGATTATAGGACTCAAC-3'	GHR- I 基因 胞内区	1129	pGEX-6P-1	pGEX-6P-1-CSGHR1-2

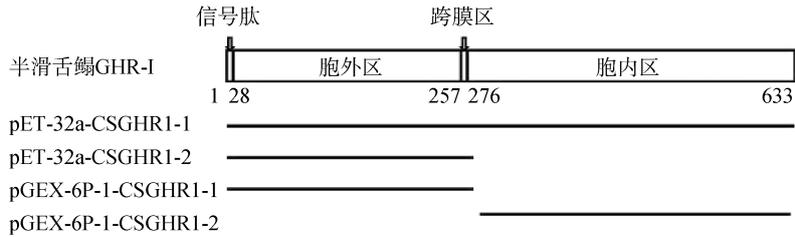


图 1 半滑舌鳎 GHR- I 基因重组质粒的构建

Fig. 1 Recombinant plasmids of *C. semilaewis* GHR-

态大肠杆菌 DH5 。经菌落 PCR 和酶切鉴定后, 将获得的半滑舌鳎 2 个包含 GH 基因和 4 个包含 GHR- I 基因的重组质粒送华大基因测序。半滑舌鳎 GHR- I 重组质粒的构建如图 1 所示。

**1.2.4 重组 GH 和 GHR- I 在大肠杆菌中的诱导表达** 将测序正确的重组质粒转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 涂布 LB 平板并于 37 培养过夜。挑取重组质粒的单菌落培养后鉴定阳性克隆。选取鉴定正确的菌液按 1 : 100 的比例接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 震荡培养至对数生长期( $OD_{600}=0.6\sim 0.8$ )。分别于 37 、 1.0 mmol/L IPTG 浓度下诱导 4 h, 未加 IPTG 诱导的重组质粒作为阴性对照。培养结束后离心收集菌体沉淀, 用 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液重悬、混匀, 100 煮沸 5 min, 冷却后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 GH、GHR- I 基因重组质粒的构建

上述 6 个重组质粒经双酶切后, 均可获得与预期长度一致的条带(表 1)。相关测序结果经 BLAST 比对后亦证明, 插入片段分别为半滑舌鳎 GH、GHR- I 基因 ORF 全序列及不同 ORF 片段, 并且插入方向正确。由此可见, 本研究成功构建了 6 个半滑舌鳎 GH、GHR- I 基因的重组质粒。其中, 分别利用表达载体 pET-32a 和 pGEX-6P-1 成功构建了半滑舌鳎 GH 基因全长 ORF 的 2 个重组质粒(pET-32a-CSGH 和 pGEX-6P-1-CSGH); 构建了 GHR- I 基因全长 ORF(pET-32a-CSGHR1-1)、胞外跨膜区(pET-32a-CSGHR1-2 和 pGEX-6P-1-CSGHR1-1)及胞内区(pGEX-6P-1-CSGHR1-2)的

重组质粒。

### 2.2 GH 在大肠杆菌中的表达

将半滑舌鳎 GH 基因的重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 进行诱导表达, 并以未诱导的 BL21 作为阴性对照。经 SDS-PAGE 检测, pET-32a-CSGH 在大肠杆菌中有表达, 在预期分子量 40 kD 处发现诱导的蛋白条带, 与预测的结果基本一致(图 2)。利用 BandScan 软件进行扫描分析, 结果表明, 目的蛋白约占菌体总蛋白的 37.6%。但 pGEX-6P-1-CSGH 在大肠杆菌中未成功表达。

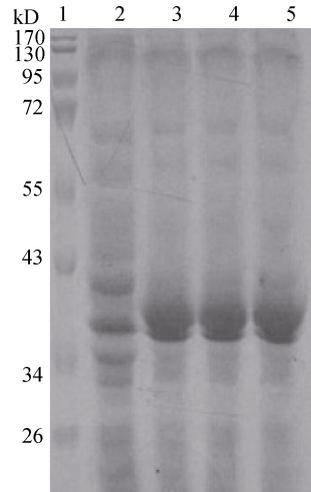


图 2 半滑舌鳎 GH 基因原核表达产物 SDS-PAGE 电泳  
1: 蛋白分子量 marker; 2: 重组质粒未诱导对照;  
3-5: 重组质粒表达产物。

Fig. 2 SDS-PAGE for the expression of GH fusion protein from *C. semilaewis*

1: M protein weight marker; 2: the uninduced control; 3-5: the induced GH protein.

### 2.3 GHR- I 在大肠杆菌中的表达

分别将半滑舌鳎 GHR- I 基因的 4 个重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 进行诱导表达, 并以未

诱导的 BL21 作为阴性对照。经 SDS-PAGE 检测, 仅有 pGEX-6P-1-CSGHR1-2 在大肠杆菌中成功表达, 在预期分子量 70 kD 处发现诱导的蛋白条带, 与预测的结果基本一致(图 3)。BandScan 软件扫描分析结果显示, 目的蛋白约占菌体总蛋白的 20.2%。但其他含有 GHR- 跨膜区的重组质粒(pET-32a-CSGHR1-1、pET-32a-CSGHR1-2 和 pGEX-6P-1-CSGHR1-1)均未获得表达产物。

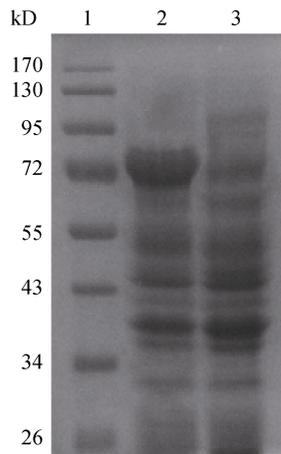


图 3 半滑舌鳎 GHR- 基因原核表达产物 SDS-PAGE 电泳

1: 蛋白分子量 marker; 2: 重组质粒表达产物;  
3: 重组质粒未诱导对照。

Fig. 3 SDS-PAGE for the expression of GHR- fusion protein from *C. semilaevis*

1: M protein weight marker; 2: the induced GHR- I protein;  
3: the uninduced control.

### 3 讨论

本研究前期克隆获得的半滑舌鳎 GH (HQ334196)和 GHR- (HQ334200)的 cDNA 全序列分别为 826 bp 和 2 364 bp。其中, GH 基因编码 200 个氨基酸, 预测其分子量为 23.15 kD; GHR-I 基因编码 633 个氨基酸, 预测其分子量为 70.62 kD。同源性分析结果表明, 本研究前期克隆到的半滑舌鳎 GH 氨基酸序列与已报道其他鲽形目鱼类的同源性在 51.6%~68.5%, 说明 GH 基因在鲽形目物种间具有较高的保守性<sup>[17]</sup>。有研究表明, 酵母表达的重组草鱼 GH 对鲤鱼亦具有促生长效应, 从而可以推测一种外源 GH 可对亲缘关系较近(同目同科)的多种鱼类起作用<sup>[18]</sup>。因而, 本研究

获得的重组半滑舌鳎 GH 有望作为舌鳎科甚至鳎亚目种类的生长促进剂, 以提高鲽形目重要经济种类的生长速度。

本研究选择了大肠杆菌 BL21(DE3)作为宿主菌, 分别选取 pET-32a 和 pGEX-6P-1 作为表达载体。结果表明, 利用 pET-32a 表达载体可成功表达半滑舌鳎的重组 GH, 但利用 pGEX-6P-1 载体并未获得预期的结果。此外, 郝羽等<sup>[1]</sup>选用表达载体 pET-28a 成功表达了军曹鱼(*Rachycentron canadum*)GH 融合蛋白; 冯浩等<sup>[19]</sup>也利用 pET-28a 表达载体获得青鱼(*M. piceus*)的重组 GH。由此可推测 pET 系列载体在鱼类重组 GH 的表达方面具有较强的适用性。

在 GHR 的外源表达方面, Sobrier 等<sup>[20]</sup>对人 GHR 进行了真核表达, 并证明了其表达产物与人 GHR 具有相同的结合 GH 的能力。李吉涛等<sup>[21]</sup>构建了五指山猪(*Sus scrofa*) GHR 基因真核表达载体, 为进一步研究 GHR 的功能和下游信号转导奠定了基础。本研究成功构建了半滑舌鳎 4 个包含 GHR- 基因 ORF 全序列及部分 ORF 序列的重组质粒, 但仅有 pGEX-6P-1-CSGHR1-2 获得成功表达。推测其原因可能为: (1) 跨膜区对外源蛋白原核表达有影响。有研究表明, 跨膜蛋白基因由于存在 C 端的跨膜区可影响其融合蛋白的表达<sup>[22]</sup>。孙润红等<sup>[23]</sup>亦发现只有切除跨膜区的 Imp 基因的基因序列能得到大量表达。由此可见, 半滑舌鳎 GHR- 基因的跨膜区可能影响其在大肠杆菌中的表达。(2) 原核细菌具有密码子偏爱性, 并存在 8 种稀有密码子<sup>[24]</sup>。如果外源基因含有较高比例的稀有密码子, 其表达效率往往不高。而半滑舌鳎 GHR- 基因编码区含有 CCT(19)、CTC(16)和 GTC(15)等共 78 个稀有密码子, 因而按照常规的实验方法可能难以获得原核表达产物。(3) 外源细胞生长因子可能与单细胞生物中的细胞因子产生竞争, 从而影响重组蛋白的表达<sup>[25]</sup>。

据报道, GHR- 具有细胞外 N 末端配体结合域和单一跨膜区的复杂蛋白结构<sup>[26]</sup>。其胞外区为激素结合区, 在该区域含有的半胱氨酸残基两两

形成二硫键, 形成 GHR 的特定空间结构; 另外, 该区域存在的保守的糖基化位点是与配体结合的部位。而大肠杆菌表达系统作为原核表达系统, 缺乏对表达的真核蛋白的翻译后加工功能, 使得表达的蛋白的生物活性得不到保障<sup>[27]</sup>。酵母作为低等的单细胞真核生物, 不仅具备大肠杆菌表达系统增殖快、易培养、便于基因操作等特性, 同时又具有真核生物的蛋白质翻译后加工的功能和重组蛋白正确折叠的细胞内环境, 可以增加蛋白的稳定性、减少表达产物对宿主菌的毒害作用, 是真核生物基因的理想表达载体<sup>[28]</sup>。因此, 下一步实验应考虑选用酵母表达系统构建 GHR- 的真核表达载体来获得半滑舌鲷的重组 GHR- , 用以揭示 GHR- 的生物学活性和功能。

半滑舌鲷主要分布于渤、黄海, 是中国重要的名贵海水鱼类和理想的近海增殖对象。但其同龄雌雄个体的大小和生长速度存在显著差异, 雌鱼的生长速度是雄鱼的 2~3 倍。自然水域中, 雌鱼的平均体长为 523 mm, 而雄鱼的平均体长仅为 280 mm<sup>[29]</sup>。半滑舌鲷这种雌雄个体大小和生长速度的差异严重制约了其养殖产业化进程。已有报道表明, 动物的矮小型性状可能受到 GHR- 活性的影响。例如: 禽类的生长在很大程度上决定于靶组织中的 GHR<sup>[30]</sup>。Burnside 等<sup>[31]</sup>通过检测鸡肝脏细胞的 GHR 结合活性, 发现正常公鸡为 7.1%, 杂合公鸡为 3.9%, 而矮小型则几乎检测不到这种受体。关于鱼类该方面的研究, 马细兰等<sup>[32]</sup>研究证实尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)雄鱼垂体和肝脏中的 GHR mRNA 的表达量均明显高于雌鱼, 表明垂体和肝脏的 GHR mRNA 表达的雌、雄差异是雌、雄生长差异的主要原因。

本研究对半滑舌鲷 GH 和 GHR- 原核表达进行了初步探讨, 后续实验可将获得的表达产物进行蛋白质印迹分析(Western Blot)和蛋白纯化后, 根据激素受体结合原理, 通过酶联免疫吸附测定(Elisa)、免疫组织化学等方法, 检测雌、雄半滑舌鲷 GH 和 GHR- 的结合能力是否存在差异, 探讨 GHR- 的结合活性与半滑舌鲷生长的性别二态

性是否存在联系; 此外, 利用获得的重组蛋白进一步制备用于 Western Blot 检验的 GH 和 GHR- 多克隆抗体, 检测雌、雄半滑舌鲷体内 GH 和 GHR- 含量的差异, 有助于从蛋白水平揭示两个生长因子在调控半滑舌鲷生长发育的性别二态性中的重要作用。

#### 参考文献:

- [1] 郝羽, 邓思平, 刘丽, 等. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*) 生长激素基因 cDNA 的克隆和原核表达[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(3): 409-413.
- [2] Emtner M, Mathews L S, Norstedt G. Growth hormone (GH) stimulates protein synthesis in cells transfected with GH receptor complementary DNA[J]. Mol Endocrinol, 1990, 4(12): 2014-2020.
- [3] Donaldson E M, Fagerlund U H M, Higgs D A, et al. Hormonal enhancement of growth [J]. Fish Physiol, 1979, 8: 455-597.
- [4] Sekine S, Mizukami T, Nishi T, et al. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli* [J]. P Natl Acad Sci USA, 1985, 82(13): 4306-4310.
- [5] Jeh H S, Kim C H, Lee H K, et al. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration [J]. J Biotechnol, 1998, 60(3): 183-193.
- [6] Ben-Atia I, Fine M, Tandler A, et al. Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration [J]. Gen Comp Endocr, 1999, 113(1): 155-164.
- [7] Feng H, Cheng J, Liu Y, et al. In vitro expression and Antibody Preparation of Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*) GH [J]. Hereditas, 2005, 27(5): 729-734.
- [8] McLean E, Donaldson E M, Teskeredzic E, et al. Growth enhancement following dietary delivery of recombinant porcine somatotropin to diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 11(1): 363-369.
- [9] Sire M F, Vernier J M. Intestinal absorption of protein in teleost fish [J]. Comp Biochem Physiol. A. Comp Physiol, 1992, 103(4): 771-781.
- [10] Moriyama S, Yamamoto H, Sugimoto S, et al. Oral

- administration of recombinant salmon growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 1993, 112(1): 99–106.
- [11] Duan C, Hirano T. Plasma kinetics of growth hormone in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Aquaculture*, 1991, 95(1-2): 179–188.
- [12] Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Perez-Sanchez J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Gen Comp endocr*, 2005, 142(1-2): 193–203.
- [13] Fukada H, Ozaki Y, Pierce A L, et al. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting [J]. *Gen Comp endocr*, 2004, 139(1): 61–71.
- [14] Jiao B W, Huang X G, Chan C B, et al. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream [J]. *J Mol Endocr*, 2006, 36(1): 23–40.
- [15] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布[J]. *海洋水产研究*, 1988, (9): 11–89.
- [16] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 7–14.
- [17] Ma Q, Liu S F, Zhuang Z M, et al. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Gene*, 2012, 493(1): 92–104.
- [18] 王伟, 汪亚平. 酵母表达的重组草鱼生长激素对鲤鱼的促生长效应[J]. *高技术通讯*, 2000, 10(12): 5–8.
- [19] 冯浩, 成嘉, 刘妍, 等. 青鱼生长激素的重组表达及其多克隆抗体的制备[J]. *遗传*, 2005, 27(5): 729–734.
- [20] Sobrier M L, Duquesnoy P, Duriez B, et al. Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor [J]. *FEBS Lett*, 1993, 319(1-2): 16–20.
- [21] 李吉涛, 牟玉莲, 张莉, 等. 近交培育五指山小型猪 GHR 基因的克隆及其真核表达载体的构建[J]. *实验动物科学*, 2007, (6): 60–63, 59.
- [22] Santhanam R, Panda A K, Kumar V S, et al. Dog Zona Pellucida Glycoprotein-3 (ZP3): Expression in *Escherichia coli* and Immunological Characterization [J]. *Protein Express Purif*, 1998, 12(3): 331–339.
- [23] 孙润红, 于祥泉, 陶焯, 等. 小麦蓝矮植原体免疫膜蛋白 (Imp) 的跨膜区影响其在大肠杆菌中的表达[J]. *植物病理学报*, 2010, (6): 587–592.
- [24] Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes [J]. *Gene*, 1982, 18(3): 199–209.
- [25] Curtin J F, Cotter T G. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2003, 15(11): 983–992.
- [26] Moutoussamy S, Kelly P A, Finidori J. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 255(1): 1–11.
- [27] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human  $\alpha$ -interferon in silkworm using a baculovirus vector [J]. *Nature*, 1985, 315(6020): 592–594.
- [28] 张学成, 刘顺梅, 臧晓南. 鱼类生长激素的异源表达, 应用及安全性评价[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2008, 37(6): 939–946.
- [29] 孟田湘, 任胜民. 渤海半滑舌鳎的年龄与生长[J]. *海洋水产研究*, 1988, (9): 173–183.
- [30] Burnside J, Liou S S, Cogburn L A. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens [J]. *Endocrinology*, 1991, 128(6): 3183–3192.
- [31] Burnside J, Liou S S, Zhong C, et al. Abnormal growth hormone receptor gene expression in the sex-linked dwarf chicken [J]. *Gen Comp Endocr*, 1992, 88(1): 20–28.
- [32] 马细兰, 张勇, 刘晓春, 等. 雄尼罗罗非鱼肝脏 2 种生长激素受体基因表达的发育性变化[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 1–7.

## Prokaryotic expression of growth hormone and its receptor genes in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

MA Qian, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng, TANG Qisheng

Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

**Abstract:** In this study, the GH and GHR-I sequences of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) were sub-cloned into the expression vectors pET-32a and pGEX-6P-1, respectively. Subsequently, these recombinant plasmids were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The total bacterial proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). As a result, a new specific GH band expressed by using the pET-32a vector (pET-32a-CSGH) was found with molecular mass of about 40 kD, and a new specific GHR-I band expressed by using the pGEX-6P-1 vector (pGEX-6P-1-CSGHR1-2) was found with molecular mass of about 70 kD. The GH and GHR-I recombinant proteins were expressed and composed of 37.6% and 20.2% of the total bacterial proteins, respectively. However, pGEX-6P-1-CSGH and the other three recombinant plasmids (pET-32a-CSGHR1-1, pET-32a-CSGHR1-2 and pGEX-6P-1-CSGHR1-1) containing the sequences of GHR-I trans-membrane domain were not successfully expressed. The relevant results showed that the trans-membrane domain of the GHR-I might have an influence on its prokaryotic expression from *C. semilaevis*. These findings may lay a theoretic foundation for applying the growth-promoting effects of GH and GHR-I to the aquaculture industry.

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis*; growth hormone gene; growth hormone receptor I gene; prokaryotic expression

**Corresponding author:** LIU Shufang. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn