

## 狐狸生长激素基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

李巍<sup>1</sup>, 李秀锦<sup>2</sup>, 仲飞<sup>1</sup>, 靳慧君<sup>1</sup>, 解民<sup>1</sup>, 刘玉芝<sup>1</sup>, 刘龙飞<sup>1</sup>, 苏清洁<sup>1</sup>

1 河北农业大学动物科技学院基础兽医部, 保定 071001

2 燕山大学环境与化学工程学院生物工程系, 秦皇岛 066004

**摘要:** 为制备重组狐狸生长激素(fGH), 采用 RT-PCR 方法, 从银狐垂体中扩增 *fGH* cDNA 基因, 利用 *Sna*B I 和 *Not* I 位点将 *fGH* 基因插入到酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中  $\alpha$ -因子信号肽的下游, 构建成 *fGH* 基因的酵母分泌型表达载体 pPIC9K/*fGH*, 载体经 *Sal* I 酶切线性化后, 通过电转移将线性化的 pPIC9K/*fGH* 转化到组氨酸缺陷型酵母宿主菌 GS115 中。然后利用不含氨基酸的以葡萄糖为碳源的培养基(MD)和以甲醇为碳源的培养基(MM)筛选出组氨酸 His<sup>+</sup>型和甲醇利用正型(Mut<sup>+</sup>)酵母重组体, 再经 G418 加压筛选出高拷贝 *fGH* 基因的重组酵母, 经摇瓶发酵培养和甲醇诱导使 fGH 进行分泌表达。结果表明本实验扩增的 *fGH* 基因序列与 GenBank 发表的序列基本一致, 发酵液经 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测证明构建的重组酵母能够分泌表达 fGH, 表达的 fGH 占发酵液总蛋白的 34%, 表达量达 119 mg/L 发酵液。

**关键词:** 狐狸生长激素, cDNA, 毕赤酵母, 分泌表达

## Cloning and expression of fox growth hormone gene in *Pichia pastoris*

Wei Li<sup>1</sup>, Xiujin Li<sup>2</sup>, Fei Zhong<sup>1</sup>, Huijun Jin<sup>1</sup>, Min Xie<sup>1</sup>, Yuzhi Liu<sup>1</sup>, Longfei Liu<sup>1</sup>, and Qingjie Su<sup>1</sup>

1 Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

2 Department of Biotechnology, College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China

**Abstract:** To prepare recombinant fox growth hormone (fGH), we amplified its cDNA from silver fox pituitary tissue by RT-PCR and cloned into yeast shuttle vector pPIC9K down stream of  $\alpha$ -factor signal peptide sequence by *Sna*B I and *Not* I restriction sites. The recombinant secretion vector pPIC9K/*fGH*, linearized by *Sal* I, was transformed into histidine-deficient *Pichia pastoris* strain GS115 by electroporation. We selected His<sup>+</sup>-transformed methylotropic (His<sup>+</sup>, Mut<sup>+</sup>) yeast using histidine-absent medium containing dextrose (MD) or methanol (MM) as the only carbon source, and then screened the recombinant GS115 with multi-copy *fGH* genes by G418. The secretive expression of fGH was performed under the induction of methanol in shaking flask culture. The results showed that the *fGH* cDNA sequence amplified in this paper was basically in consistence with the published in GenBank. We achieved the secretive expression of recombinant fGH identified by SDS-PAGE and Western blotting. The fGH expression level was 119 mg/L, accounted for 34% of total proteins in fermentation medium.

**Keywords:** fox growth hormone, cDNA, *Pichia pastoris*, secretive expression

生长激素(Growth hormone, GH)是由脑垂体前叶分泌的能促进动物生长的一种激素, 它一般由约

**Received:** March 23, 2009; **Accepted:** August 6, 2009

**Supported by:** Science and Technology Program of Hebei Province(No. 07220401D), President Foundation of Agricultural University of Hebei (No. XZJJ2005-06).

**Corresponding author:** Xiujin Li. Tel: +86-335-8079169; Fax: +86-335-8061569; E-mail: lixiujin9824@yahoo.com.cn

河北科技支撑计划项目(No. 07220401D), 河北农业大学校长基金项目(No. XZJJ2005-06)资助。

190 个氨基酸组成。GH 可以刺激细胞分裂, 促进骨骼的生长和蛋白质合成, 具有增加动物的体重、产毛量、提高饲料转化率和瘦肉率等重要功能<sup>[1-3]</sup>。

20 世纪 80 年代以来, 人们相继克隆了人、牛、猪等多种动物的生长激素基因, 并利用大肠杆菌制备了重组生长激素, 通过给动物注射重组生长激素可明显提高动物的生长速度, 给养殖业带来可观的经济效益<sup>[4-6]</sup>。然而随着人们生活水平的提高, 人们不仅仅重视畜禽食用产品的数量, 而且更重视其质量, 生长激素在畜禽产品中是否存在残留问题, 食用后是否会影响人类的身体健康一直颇受争议。所以通过注射重组生长激素来提高以肉、乳、蛋为产品的养殖业的经济效益不再被人们提倡。但如果通过注射重组生长激素, 以提高皮毛动物(如狐狸、水貂等)的生长速度和经济效益将会有很好的市场前景。为此本实验通过 RT-PCR 方法扩增了银狐生长激素基因, 构建了表达银狐生长激素基因的酵母工程菌, 实现狐狸生长激素在毕赤酵母表达系统中的表达。这为将来重组 fGH 在狐狸养殖业上的应用创造了必要的条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 由本实验室保存。pMD18-T 载体购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司。*Pichia pastoris* GS115(组氨酸缺陷型菌株)和酵母表达载体 pPIC9K 均购自美国 Invitrogen 公司。

#### 1.1.2 主要试剂

Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 反转录酶 M-MLV、*Taq* DNA 聚合酶购自 Promega 公司; 限制性内切酶、蛋白分子量 Marker 和 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、Bradford 蛋白定量试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; Tryptone、Yeast Extract、YNB、山梨醇为德国 Sigma 公司产品; Biotin 为加拿大 Biobasic 公司产品; G418 购自美国 Invitrogen 公司; 预染蛋白分子量 Marker 为 Bio-Rad Laboratories 产品;

其他试剂为国产或进口分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *fGH* 基因的克隆和序列测定

根据银狐生长激素基因(GenBank Accession No. E07594)的序列, 设计和合成如下 1 对引物:

fGH<sub>2</sub>-F: 5'-CGGGGTACCACCATGGCTGCAA GCCCTCG-3';

fGH<sub>2</sub>-R(NS): 5'-CTAGTCTAGACGAGAAGGC ACAGCTGCTTTC-3'。

用 Trizol 试剂法提取银狐垂体的总 RNA<sup>[7]</sup>, 以 Oligo dT 为引物在 M-MLV 反转录酶作用下合成 cDNA 第一链, 然后以 cDNA 为模板, 利用合成的引物, 通过 PCR 方法扩增 *fGH* 基因。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 1 min, 55°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后在 72°C 延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

利用试剂盒回收扩增的 PCR 产物, 并将其与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 次日挑选单菌落进行摇菌培养, 提取质粒, 然后进行酶切鉴定。将酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工生物工程公司进行序列测定, 测序正确的重组质粒命名为 pMD18-T-*fGH*。

#### 1.2.2 重组 pPIC9K/*fGH* 质粒的构建及鉴定

以 pMD18-T-*fGH* 为模板, 利用如下引物通过 PCR 扩增 5'带有 *Sna*B I 和 3'带有 *Not* I 位点的 *fGH* 基因片段(这两个酶切位点为构建 pPIC9K/*fGH* 质粒的插入位点)。

Yeast-fGH-F(5'-3'): CCGCTACGTATTCCCAG CCATGCCCTTGTC(下划线处为 *Sna*B I 位点);

Yeast-fGH-R(5'-3'): ATAAGAATGCGGCCGCCT AGAAGGCACAGCTGCTTTC(下划线处为 *Not* I 位点)。

反应体系为: pMD18-T-*fGH* 模板 1  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 10  $\mu$ L, dNTP 混合物 (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 4  $\mu$ L, *Taq* 酶 (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L (25 pmol/ $\mu$ L), 用灭菌去离子水调至 50  $\mu$ L 体系。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒从 1.0%琼脂糖凝胶中回收扩增的 *fGH*-cDNA 片段, 用 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切后进行纯化, 将纯化产物与用相同双酶切处理过的 pPIC9K 载体进行连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。获得的重组质粒经酶切鉴定, 筛选出阳性重组质粒。将酶切鉴定正确的重组质粒送上海生物工程公司进行测序, 将构建正确的重组质粒命名为 pPIC9K/*fGH*。

### 1.2.3 重组质粒的电转化和 *Mut*<sup>+</sup>高拷贝转化子的筛选

提取测序正确的重组质粒约 10  $\mu$ g, 用 *Sal* I 线性化后, 利用 Bio-Rad 电转仪, 在 1500 V、25  $\mu$ F、200  $\Omega$  的条件下进行电击, 将重组质粒电转化至 GS115 酵母感受态细胞中。然后立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇, 混匀, 取 300  $\mu$ L 涂布于 MD(最小葡萄糖琼脂板, 不含 His)平板上, 28°C~30°C 培养约 2 d, 直至单菌落出现。

挑取 MD 板上的 His<sup>+</sup>转化子先后在 MM(最小甲醇琼脂板)与 MD 板上接种, 同时放于 30°C 温箱培养, 筛选甲醇利用正型(*Mut*<sup>+</sup>)转化子, 然后将 *Mut*<sup>+</sup>转化子分别接种于逐级增高的 G418 浓度(依次 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL)的 YPD 平板上, 得到 *fGH* 基因高拷贝转化子。

### 1.2.4 重组酵母的 PCR 鉴定

酵母基因组的提取方法参照 Invitrogen 公司 Pichia Expression Kit 操作说明进行。以提取的重组酵母基因组 DNA 为模板, 以公司提供的重组酵母通用测序引物 5'AOX1、3'AOX1 为上下游引物进行 PCR 鉴定。取 PCR 小管依次加入: 5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR Buffer, 4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 1  $\mu$ L dNTPs (15 mmol/L), 1  $\mu$ L 上游引物(25 pmol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L 下游引物(25 pmol/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L 酵母基因组 DNA, 1  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L), 最后加入 32  $\mu$ L 灭菌水至总体积 50  $\mu$ L。

反应条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 3 min, 30 个循环; 72°C 延伸 30 min。扩增产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.5 重组酵母的诱导表达及表达蛋白含量的测定

挑取高拷贝阳性重组酵母(GS115/pPIC9K/*fGH*)及对照(GS115/pPIC9K)单菌落, 分别接种于 25 mL

BMGY(Buffered Glycerol-complex medium)液体培养基中, 摇瓶(28°C~30°C, 250 r/min)培养, 摇至  $OD_{600}=2.0\sim6.0$ , 1500 $\times$ g 离心 5 min, 收集菌体并重新悬浮在 100 mL BMMY(Buffered Methanol-complex medium)培养基中, 在 25°C 条件下进行甲醇诱导培养 96 h, 每隔 24 h 向培养基中补加甲醇, 使甲醇浓度维持在 1.0%~1.5%(V/V)范围之内。培养 96 h 后, 12 000 $\times$ g 离心 5 min, 离心取上清, 鉴定表达产物。

采用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定发酵液中蛋白质的含量。具体方法如下: 以牛血清白蛋白(BSA)为标准液(1 mg/mL), 分别取 BSA 标准液 0、10、30、40、50、60  $\mu$ L, 补加 PBS 至 150  $\mu$ L。另取发酵液 10  $\mu$ L, 补加 PBS 至 150  $\mu$ L。向各试管中加入 2.85 mL 考马斯亮蓝染液, 混匀, 室温放置 5~10 min。用分光光度计测定 595 nm 处吸光度值。利用 BSA 标准液测得的  $OD$  值绘制标准曲线, 根据发酵液测得的  $OD$  值查标准曲线估计发酵液总蛋白质的含量。发酵液重组 *fGH* 的含量则依据发酵液总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱进行估计, 利用 SynGene 凝胶成像系统分析各蛋白带的百分含量, 根据其所占的百分含量计算重组 *fGH* 的含量。

### 1.2.6 猪生长激素(pGH)抗血清的制备

选择体重为 3 kg 左右的健康雄性新西兰白兔 3 只, 编号, 每只兔心脏采血 4~5 mL, 分离血清, 待以后测抗体滴度作为阴性血清对照。

取 15 mg pGH, 溶于灭菌的 3 mL 生理盐水中, 加入等量弗氏完全佐剂, 快速振荡使其成为乳浊液, 每只兔在皮下分点(5 点)注射 2 mL 乳浊液(5 mg pGH/只)。注射后每隔 10 天追加 1 次, 共追加 3 次, 追加每次用量 6 mg, 用不完全弗氏佐剂配制乳浊液。免疫 30 d 后, 心脏采血, 测定抗体滴度。

### 1.2.7 Western blotting 鉴定

用 TCA(三氯乙酸)法浓缩发酵液中的蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 电泳分析。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜, 然后用猪生长激素(pGH)抗血清(一抗)和碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG(二抗)先后分别杂交, 最后通过显色剂(NBT/BCIP)显色, 得到特异的杂交带, 用扫描仪记录杂交结果。

## 2 结果

### 2.1 *fGH* cDNA 基因的扩增及克隆

以从银狐垂体组织细胞中提取的总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增 *fGH* cDNA 基因。扩增的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳在约 650 bp 处出现明显条带, 与 *fGH* 基因的预期大小相符。

用回收试剂盒回收 PCR 产物, 将其连接到 pMD18-T 载体上, 构建重组质粒 pMD18-T-*fGH*。

重组质粒用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后得到约 2.7 kb(载体)和约 650 bp 的两条 DNA 片段, 证明 *fGH* 基因已经插入到 pMD18-T 载体上。

### 2.2 *fGH* 基因的序列分析及与其他动物的比较

测序结果显示, 本实验克隆的 *fGH* 编码序列与 GenBank 发表的银狐 GH 的序列(Accession No. E07594)有 2 个碱基的差异, 第 84 位的碱基由 G 变为 A, 第 291 位的碱基由 C 变为 T, 但均未改变氨基酸的序列。

cloned	1	ATGGCTGCAAGCCCTCGGAACCTGTGCTCCTGGCCTTCGCCTTGCTCTGCCTGCCCTGG	60
foxGH	1		60
canisGH	1	-----G-----C-----C-----	60
pigGH	1	-----G-----C-----C-----T-----C-----	60
humanGH	1	-----A-----T-----CG-----CC-----T-----T-----C-----	60
cloned	61	CCTCAGGAGGTGGCGCCTTCCAGCCATGCCCTTGTCAGCCTGTTTGCCAAAGCCCGTG	120
foxGH	61	-----G-----	120
canisGH	61	-----G-----	120
pigGH	61	A-----	120
humanGH	61	-T-----A-----GCA-T-----A-----T-----A-----G-----T-----A-----TA-----	120
cloned	121	CTCCGGGCCAGCACCTGCACCAACTGGCTGCCGACACCTACAAGAGTTTGAGCGGGCG	180
foxGH	121		180
canisGH	121		180
pigGH	121	-----G-----C-----C-----	180
humanGH	121	-----C-----GT-----G-----CTTT-----C-----G-----AGAA-----C-----	180
cloned	181	TACATCCCCGAGGGACAGAGGTACTCCATCC-----AGAACGCGCAGGCCGCCTTCTGCTTC	237
foxGH	181		237
canisGH	181		237
pigGH	181	-----G-----C-----T-----	237
humanGH	181	-T-----AA-----A-----A-----T-----AT-----TGC-----C-----C-----A-----T-----C-----T-----	240
cloned	238	TCGGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGGACGAGGCCAGCAGCGATCCGATGTGGAG	297
foxGH	238		297
canisGH	241		297
pigGH	241		297
humanGH	241	-A-----T-----T-----A-----A-----T-----CAA-----G-----G-----AA-----A-----AA-----A-----CC-----A-----	300
cloned	298	CTGCTCCGCTTCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTCGGGCCCGTGTCAGTTTCTCAGC	357
foxGH	298		357
canisGH	298	-----G-----G-----C-----	357
pigGH	298		357
humanGH	301	-----A-----G-----A-----C-----G-----	360
cloned	358	AGGGTCTTACCAACAGCCTGGTGTTCGGCACCTCAGACCGA-----GTCTACGAGAAGCTC	414
foxGH	358		414
canisGH	358		414
pigGH	358	-----T-----C-----G-----	414
humanGH	361	-T-----G-----A-----G-----T-----A-----CAAC-----T-----CCTC-----A-----	420
cloned	415	AAGGACCTGGAGGAAGGCATCCAAGCCCTGATCGGGAGCTGGAAGATGGCAGTCCCCGG	474
foxGH	415		474
canisGH	415		474
pigGH	415	-----G-----G-----G-----C-----A-----	474
humanGH	421	-----A-----A-----G-----G-----AG-----C-----	480
cloned	475	GCCGGGCAGATCCTGAAGCAGACCTACGACAAGTTTGACACGAACCTGCGCAGTGACGAT	534
foxGH	475		534
canisGH	475		534
pigGH	475	-----C-----A-----A-----A-----T-----T-----C-----	534
humanGH	481	-T-----T-----C-----AG-----C-----A-----TCA-AC-AC-----T-----C-----	540
cloned	535	GCGCTGCTTAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAAGACCTGCATAAGGCCGAG	594
foxGH	535		594
canisGH	535		594
pigGH	535	-----G-----C-----T-----A-----	594
humanGH	541	-A-----A-----C-----A-----G-----G-----A-----G-----C-----T-----	600
cloned	595	ACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCGCGCTTCGTGGAAGCAGCTGTGCCTTCTAG	651
foxGH	595		648
canisGH	595		648
pigGH	595	-----G-----TAG	651
humanGH	601	-A-----T-----C-----G-----C-----CT-----GG-----G-----	654

图 1 银狐 *fGH* 基因的测序结果及与犬、猪、人的比较

Fig. 1 Sequence of *fGH* gene and its comparison with those of canine, porcine and human.

通过与 GenBank 已发表的银狐(Accession No. E07594)、犬(Accession No. Z23067)、猪(Accession No. DQ415717)、人(Accession No. M13438)的 GH 序列进行比较发现,银狐 GH 基因序列与犬 GH 基因序列的同源性高达 99%以上,氨基酸序列同源性达 100%;与猪 GH 基因序列的同源性达 93%以上,氨基酸相似性达 98.7%以上;但与人 GH 基因序列的同源性仅有 78%,氨基酸的差异较大(图 1)。

## 2.3 fGH 基因重组酵母的构建

### 2.3.1 fGH 基因重组酵母穿梭质粒的构建

以 pMD18-T-fGH 为模板,利用 Yeast-fGH-F 和 Yeast-fGH-R 两条引物扩增上下游分别带有 *Sna*B I 和 *Not* I 位点的 *fGH* 基因片段,通过上述位点将 *fGH* 基因克隆到酵母表达载体 pPIC9K 上,构建成 *fGH* 基因的重组酵母穿梭质粒 pPIC9K/*fGH* (图 2A),重组质粒经 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切鉴定(图 2B),得到约 600 bp 的目的片段,证明已将 *fGH* 基因成功克隆到 pPIC9K 的正确位置上。

### 2.3.2 fGH 基因酵母工程菌的构建

将得到的重组质粒 pPIC9K/*fGH* 线性化后,通过电转化的方法使其与酵母染色体发生同源重组,在 MD 板上培养得到 His<sup>+</sup>转化子。再挑取同一单克隆在 MM 与 MD 板上同时培养,筛选得到甲醇利用正型(Mut<sup>+</sup>)的转化子,结合 PCR 的方法分析 *fGH* 基因是否整合到毕赤酵母基因组中。图 3 为用 5'AOX1、3'AOX1 通用引物通过 PCR 从酵母基因组

中扩增 DNA 片段的分析结果。由图可见,从 fGH 重组酵母基因组中同时扩增出两条片段,即 2200 bp 的野生型 AOX1 基因片段和含有 *fGH* 基因的 1086 bp 特异片段(在上、下游引物之间的 492 bp 片段中插入了 594 bp 的 *fGH* 基因片段);从空载重组酵母基因组中也可扩增出 2200 bp 的野生型 AOX1 基因片段和两引物之间的 492 bp 片段(没有外源基因插入);而从野生型 GS115 酵母基因组中仅能扩增出 2200 bp 的野生型 AOX1 基因片段。由此可见,fGH 基因表达盒已经整合到酵母 GS115 的基因组中。

## 2.4 重组 fGH 在酵母中的分泌表达及鉴定

### 2.4.1 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

本实验构建的狐狸生长激素去除了其自身所带的信号肽,剩余基因片段为 594 bp,编码 198 个氨基酸,其蛋白分子量约为 21.7 kD。从图 4 中可见,在相对分子量约为 21.7 kD 处出现目的蛋白,而空载体 GS115/pPIC9K 在该处没有出现相应的蛋白表达条带,由此结果可以初步判定银狐生长激素基因在毕赤酵母中得到表达。

### 2.4.2 表达产物的 Western blotting 鉴定

为进一步确证狐狸生长激素基因的表达,利用猪生长激素(pGH)抗血清和碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 抗体,经 Western blotting 检测,结果见图 5。由图可见,在分子量 28.9~20.6 kD 之间出现一条明显的杂交带,而空载体在相应位置未见杂交带。这说明 *fGH* 基因确实在毕赤酵母中得到表达。

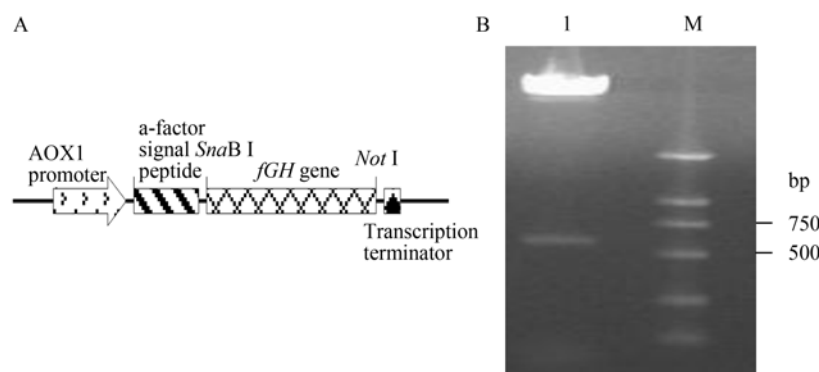


图2 pPIC9K/*fGH*重组质粒的结构及酶切鉴定图谱

Fig. 2 pPIC9K/*fGH* construct and restriction analysis. (A) Construct of pPIC9K/*fGH* recombinant plasmid. AOX1: alcohol oxidase 1. (B) Restriction analysis of pPIC9K/*fGH* recombinant plasmid. 1: recombinant plasmid digested with *Sna*B I and *Not* I digestion; M: DL2000 DNA marker.

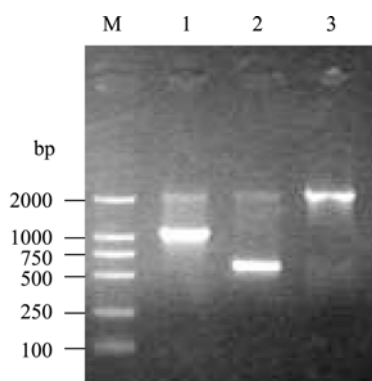


图3 重组酵母的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant yeast by PCR. 1: GS115/pPIC9K; 2: GS115/pPIC9K/fGH; 3: GS115; M: DL2000 DNA marker.

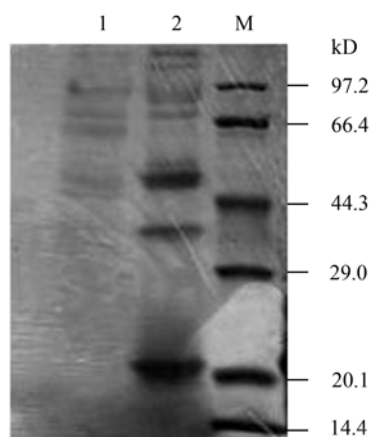


图4 fGH 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of fGH expression product. 1: GS115/pPIC9K expression supernatant; 2: GS115/pPIC9K/fGH expression supernatant; M: protein marker.

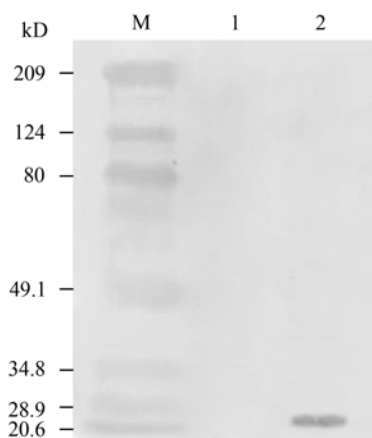


图5 fGH 表达产物的 Western blotting 鉴定

Fig. 5 Identification of fGH expression products by Western blotting. 1: GS115/pPIC9K; 2: GS115/pPIC9K/fGH; M: prestained protein marker.

### 2.4.3 表达产物的含量测定

用 SynGene 凝胶成像系统扫描图 4 的电泳图谱, 并用 SynGene GeneTools 分析软件对第 2 泳道上的蛋白条带进行分析, 得到各蛋白条带的百分含量。分析结果表明重组 fGH 蛋白约占总蛋白 34%, 发酵液总蛋白含量经 Bradford 蛋白定量试剂盒测定为 350 mg/L, 所以重组 fGH 的表达量为 119 mg/L。

## 3 讨论

银狐 GH 与其他哺乳动物 GH 一样, 是由垂体前叶产生和分泌的一种蛋白类激素, 有促进核酸和蛋白质的生物合成, 加快糖和脂肪的代谢, 促进动物骨骼、软组织及肌肉组织的生长等功能。除此之外, GH 还具有调节免疫系统的功能。

目前国内已有人用大肠杆菌原核表达系统成功表达了银狐 GH<sup>[8]</sup>。但在以大肠杆菌表达外源基因时, 特别是高效表达外源基因时, 基因表达产物在菌体内一般以包涵体的形式存在。而以这种方式聚集的蛋白质由于次级键的错配, 致使无法形成正确的立体结构, 因而没有生物活性或活性极低。在提取时, 必须破碎细胞, 释放出包涵体, 包涵体中的表达产物再经过变性和复性过程使其重新正确折叠, 才能变成具有生物活性的蛋白质。由此可见, 通过这种方法制备 fGH 的过程较为复杂。为此本试验采用毕赤酵母表达系统来表达银狐 GH。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种有效的外源基因表达系统, 具有操作简单、外源蛋白能正确的被加工与修饰、菌体易高密度发酵培养、目的蛋白表达量高且易于纯化等优点。本实验在表达银狐 GH 时, 去除了其自身所带的信号肽, 成功地将 fGH 基因片段定向插入到分泌型表达载体 pPIC9K 信号肽的下游, 实验证明银狐 GH 得到了分泌表达。

在用 Western blotting 鉴定重组 fGH 时, 采用本实验室制备的 pGH 抗血清作为一抗与 fGH 进行杂交, 成功检测到了 fGH, 说明 pGH 抗血清与 fGH 有较强的交叉反应。通过对比 fGH 与 pGH 的氨基酸序列, 发现二者的氨基酸序列同源性高达 98.7% 以上, 说明用 pGH 抗血清来检测狐狸生长激素是可行的。由此推测用 pGH 抗血清检测狗、狼等犬科动物的生长

激素也是可行的, 因为犬科动物的 GH 氨基酸序列极为相似。

本研究通过同源重组方法成功构建了银狐 GH 基因的酵母工程菌, 并实现了 fGH 在酵母中的高效分泌表达, 这为今后通过酵母大量制备重组 fGH 及其在狐狸养殖业中的应用创造了条件。

## REFERENCES

- [1] Lantinga-van L, Oudshoorn M, Irma S, *et al.* Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific start site in the absence of Pit-1. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, **150**(1/2): 121-128.
  - [2] Yoshino M, Mizutani T, Yamada K, *et al.* Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod*, 2002, **66**: 1813-1819.
  - [3] Yuhua S, Stephen A, Nancy EC. The human growth hormone gene cluster locus control region supports position-independent pituitary and placenta-specific expression in the transgenic mouse. *Biol Chem*, 2000, **275**(11): 7902-7909.
  - [4] Hintg RL. Untoward events in patients treated with growth hormone in the USA. *Horm Res*, 1992, **38**: 44-49.
  - [5] Flint DJ, Gardner MJ. Influence of growth hormone deficiency on growth and body composition in rats: site-specific effects upon adipose tissue development. *Endocrinology*, 1993, **137**: 203-211.
  - [6] Woychik RP, Camper SA, Lyons RH, *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res*, 1982, **10**: 197-210.
  - [7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156-159.
  - [8] Liu YT, Hu XH, Yan LH, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of growth hormone cDNA from Vulpes. *China Anim Husb Vet Med*, 2008, **35**(4): 26-30.
- 刘玉堂, 胡晓航, 闫丽辉, 等. 银狐生长激素 cDNA 克隆和原核表达. *中国畜牧兽医*, 2008, **35**(4): 26-30.

## 本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
东曹达(上海)贸易有限公司	封底	生物谷网站	内页
杰能科生物工程有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	泰州贝今生物技术有限公司	内页