

口服型重组草鱼生长激素基因的创建 及其原核表达最佳条件研究

赵燕, 吕若萱, 操志晨, 朱波润, 张芯玮, 唐清美, 张秋胜

(鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264039)

摘要: 生长激素是脊椎动物分泌的一种多肽激素, 具有调节鱼类生长发育和代谢等作用。本研究通过将反式转录激活因子(TAT, Trans-activating transcriptional activator)、草鱼生长激素(GH, growth hormone)和细胞穿透环肽(CP, cyclic peptides)等三个基因片段, 柔性拼接成一种新型口服型渔用生长激素基因(TGC)并构建其原核表达载体, 再将其转化至表达菌株 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中, 获得基因工程菌(TGC-DE3), 并对该基因工程菌原核表达条件进行优化。结果表明, 柔性拼接后得到的 TGC 基因片段完整并正向整合到表达载体, TGC-DE3 基因工程菌能诱导表达得到分子质量约 34.0 kDa 的目的蛋白。当 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L, 诱导温度为 37 ℃, 诱导转速为 100 rpm, 诱导表达达到最佳时间 1.5 h 时, 目的蛋白表达量最高。本研究为渔用生长激素的使用从注射走向口服提供了可能, 也为口服型草鱼生长激素蛋白的规模化原核表达生产提供了技术支持。

关键词: 重组生长激素; 原核表达; 反式转录激活因子; 细胞穿透环肽

中图分类号: S96 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8020(2020)01-0040-08

生长激素是包括鱼类在内的所有脊椎动物脑下垂体分泌出的一种单链多肽激素, 具有调节鱼类生长发育和加速蛋白质合成等作用, 但生长激素在鱼体内合成较少而不足以满足生产需求, 且肠道吸收生长激素的能力有限。注射是人工喂食鱼类生长激素的常用方法, 但其工作量大, 且操作繁琐, 难度大^[1]。口服型生长激素, 可解决生长激素必须注射的难题, 同时通过喂食, 不仅劳动强度小, 而且鱼类应激反应低, 具有良好的应用前景。

利用基因工程技术在基因工程菌中诱导表达鱼类生长激素, 是生产生长激素的常用方法^[2-3]。TAT 是天然来源的穿膜肽, 具有较好的生物相容性, 在体内表现出较好的穿膜效果, TAT 穿膜肽与其它蛋白形成的融合蛋白可在不改变原蛋白质生物学功能的条件下透过细胞膜^[4-5]。细胞穿透环肽, 是一类不仅自身可穿过细胞膜或组织屏障, 还可以通过内吞或直接穿透等机制运载蛋白质等生物大分子进入细胞内发挥其效应功能的短肽, 具有良好的生物相容性、对细胞毒性小、入胞转运后可被降解和能直接与生物活性蛋白融合进行重组

表达等优点^[6-7]。另外, 基因工程重组的生长激素也具有生物学活性^[8]。本实验构建了口服型重组草鱼生长激素基因并获得其最佳的原核表达条件, 这将为草鱼生长激素蛋白从注射走向口服, 便于生产应用, 提供了可能。同时, 也为规模化生产口服型重组草鱼生长激素蛋白提供了最佳的反应条件, 对后续的应用开发具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

大肠杆菌 DH5 α , 大肠杆菌 BL21 (DE3) 和表达载体 pET-28a 均由本实验室保存; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 2 \times PCR MIX 酶、DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购于北京全式金生物技术有限责任公司。

收稿日期: 2019-09-17; 修回日期: 2019-11-26

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2016CM10); 山东省重点研发计划(2018GSF121035); 山东省高等学校科技计划项目(J13LE09)

第一作者简介: 赵燕(1999—), 女, 江西抚州人, 研究方向为水产动物病害防治。E-mail: 577088592@qq.com

通信作者简介: 张秋胜(1974—), 男, 湖北黄冈人, 副教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为水产动物病害防治。E-mail: qiushengzhang@ldu.edu.cn

1.2 TGC 基因的合成

采用重叠延伸 PCR 技术 (gene splicing by overlap extension PCR, SOE PCR): 该技术利用具

P_1 : 5'-GATCCATGGCCTGCAGCTCGAAGAAATCCAAGCACTGCCGCGGCAGCGGCAGCGGC-3';

P_2 : 5'-GATGACTGCGTTGTTGAAGAGCCGCTGGTTCTCTGACATGCTGCCGCTGCCGCTGCC-3';

P_3 : 5'-GCCGGAGCCGCCAGGGTGCAGTTGAGTCCAGGGATCTC-3';

P_4 : 5'-CTGGGCGGCTCCGGCAGCGCGGCTCCGGCAGCGCGGCTCCGGCAGCTACGGCGCGGC-3';

P_5 : 5'-GCTCATCTTTCTCAGACGCGCGGCTGGCGGCGCGCGCGCGCTAGCTGCC-3'.

第一轮, 以引物 P_1 与 P_2 的等量混合物为模板 (T_1), 使用引物 P_1 与 P_2 进行 PCR 扩增, 采用 50.0 μ L 体系: ddH₂O 22.5 μ L; T_1 0.5 μ L; P_1 1.0 μ L; P_2 1.0 μ L; 2 \times PCR Mix 酶 25.0 μ L, 设置参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 32 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 得到 TAT 片段. 第二轮, 以 TAT 片段和 GH 基因片段的等量混合物为模板 (T_2), 用引物 P_1 和 P_3 进行扩增, 采用 50.0 μ L 体系: ddH₂O 22.5 μ L; T_2 0.5 μ L; P_1 1.0 μ L; P_3 1.0 μ L; 2 \times PCR Mix 酶 25.0 μ L, 反应参数同第一轮, 扩增后得到 TAT-GH 基因. 第三轮, 以引物 P_4 和 P_5 的等量混合物为模板, 用引物 P_4 和 P_5 进行扩增, 反应条件同上, 回收得到 CP 基因. 第四轮, 以 TAT-GH 基因和 CP 基因的等量混合物为模板, 用引物 P_1 和 P_5 进行扩增, 反应条件同上, 回收得到 TGC 基因.

1.3 构建表达载体与转化表达菌株

本实验重组质粒的构建路线如图 1(c) 所示, 实验步骤如下: 分别将含有 TGC 基因片段与 pET-28a 载体的质粒用 EcoR I 酶和 BamH I 酶进行双酶切, 酶切体系 50.0 μ L: 10 \times buffer 5.0 μ L, 目的片段 20.0 μ L, ddH₂O 22.0 μ L, EcoR I 1.0 μ L, BamH I 2.0 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 将酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后进行 DNA 胶回收. 用 T4 DNA 连接酶将 TGC 基因片段和 pET-28a 载体于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 最后将测序正确的重组表达质粒转化到表达菌株 DE3 中, 再将含目标质粒的大肠杆菌菌液扩大培养并保藏.

1.4 TGC 蛋白的诱导条件优化

按 1:100 的比例将大肠杆菌液接种于 LB 液

有互补末端的引物, 使 PCR 产物形成重叠链, 通过重叠链的延伸将来源不同的扩增片段重叠拼接. 实验分四步进行扩增, 完成了 TGC 基因的拼接. 设计的扩增用引物如下:

体培养基中一级培养过夜, 再接种一级培养产物进行二级培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.5 (培养条件均为 37 $^{\circ}$ C, 150 rpm), 然后按菌液: IPTG 为 1:1000 加入 IPTG 进行诱导表达, 遵循单一变量原则, 优化诱导表达条件^[9]. 诱导后处理样品: 取 1 mL 样品, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后去上清再加 1 mL 1 \times PBS 缓冲液混匀, 重复离心, 去上清再加 100 μ L 1 \times PBS 缓冲液和 100 μ L 2 \times SDS Loading Buffer, 沸水浴 10 min, 然后将样品 10000 rpm 离心 10 min, 小心吸取上清液点样. 在浓度为 4% 的浓缩胶和 12% 的分离胶中进行 SDS-PAGE 电泳: 先 60 V, 30 min 后 120 V, 120 min, 用考马斯亮蓝 R250 染色液染色 20 min, 加脱色液脱色, 20 min 后换脱色液, 最后脱色过夜 (染色、脱色均在摇床上缓慢振荡)^[10]. 最后用 Gel-Pro analyzer 软件分析聚丙烯酰胺凝胶条带, 积分光密度 (Integrated Optical Density, IOD) 为所测结构范围内各像素光密度值之和, 可反映所测结构的光密度与面积的综合变化, 故本实验选用 IOD 分析融合蛋白条带, 以期客观衡量其面积大小与颜色深浅, 从而比较目的蛋白的表达量.

1.4.1 IPTG 诱导浓度的优化

在 37 $^{\circ}$ C, 150 rpm 的条件下, 分别用不同的 IPTG 诱导浓度: 0.03, 0.05, 0.08, 0.10 mmol/L 诱导表达 4.0 h.

1.4.2 IPTG 诱导时间的优化

在 37 $^{\circ}$ C, 150 rpm 的条件下, 用 0.05 mmol/L 的 IPTG 分别诱导 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h.

1.4.3 IPTG 诱导转速的优化

在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 用 0.05 mmol/L 的 IPTG 分别在诱导转速为 100, 200, 300 rpm 下诱导 1.5 h.

1.4.4 IPTG 诱导温度的优化

在 0.05 mmol/L IPTG, 100 rpm 的条件下, 诱

导温度分别为 25 28 30 33 37 °C ,诱导 1.5 h.

1.4.5 TGC 蛋白的最佳诱导表达

在上述最佳诱导表达条件下用 IPTG 诱导表达至最终培养产物为 1.0 L ,并用 SDS-PAGE 对表达产物进行检测.

1.5 TGC 蛋白的纯化及浓度的测定

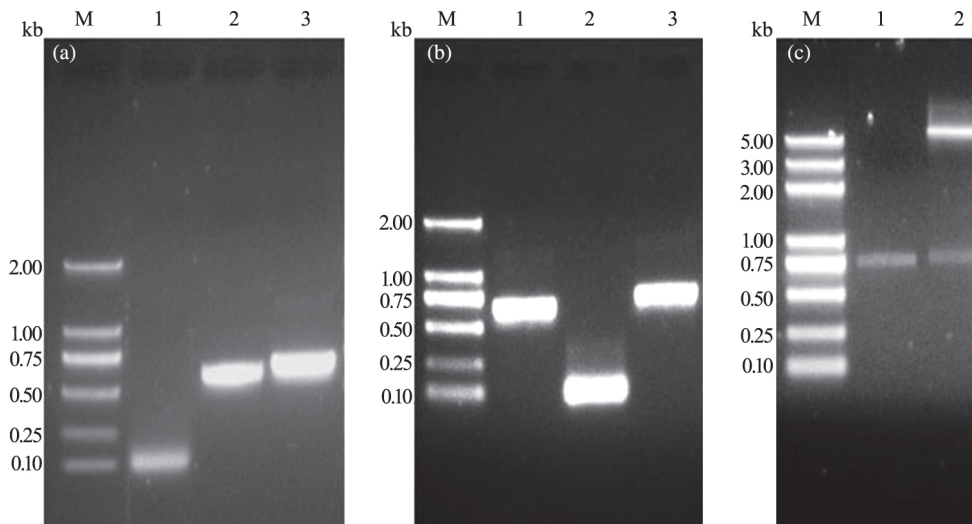
取 1.0 L 经鉴定后正确表达 TGC 融合蛋白的菌液分批进行超声(超声时间 5 s ,间隔时间 10 s ,功率 200 W ,工作时间 15 min) ,超声后在 4 °C , 6000 r/min 条件下离心 15 min ,用 1×Binding Buffer (4 mol/L NaCl ,160 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 0.272 g 咪唑) 洗涤沉淀 ,重复两次.将沉淀在含尿素的 1×Binding Buffer 中 4 °C 溶解 ,过夜.用镍离子螯合亲和层析柱(Ni 亲和层析柱) 纯化目的蛋白:先用变性液(8.0 mol/L Urea ,10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) ,100 mmol/L NaH₂PO₄) 充分平衡 Ni 亲和层析柱 ,然后加入上述过夜溶解后的样品 ,用含 30 mmol/L 咪唑的变性液洗脱杂蛋白 ,再用含 250 mmol/L 咪唑的变性液洗脱目的蛋白 ,按每 1 mL 分步收集 ,收集后分别加 2 倍体积的无水乙醇于 -20 °C 静置 1 h ,4 °C 6000 r/min 离心 10 min ,弃上清 ,沉淀用适量的 1×PBS 溶解 ,

-20 °C 保存^[11] .利用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid ,BCA) 法测定上述纯化后的 TGC 蛋白浓度^[12] .另外 ,取 20.0 μL 纯化后的 TGC 蛋白按上述样品处理方法处理样品 ,进行 SDS-PAGE 检测.

2 结果

2.1 TGC 基因的合成及其原核表达载体的构建

本实验采用 SOE-PCR 技术对重组 TGC 基因进行分步扩增 ,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 ,第一次扩增的片段大小约为 110 bp ,第二次扩增的大小约为 650 bp ,与目的基因片段大小基本相符 结果如图 1((a) (b)) 所示.第三次扩增得到的 CP 片段大小约为 100 bp ,最后第四次扩增得到 TGC 基因片段大小约 750 bp.将扩增得到的 TGC 基因片段与提取的 pET-28a 质粒用 EcoR I 酶和 BamH I 酶进行双酶切 ,酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 结果如图 1(c) 所示 ,出现双条带 ,一条为目的基因带 ,一条为载体带.



(a) (b) 口服型重组生长激素的基因片段的构建图; (c) 表达载体酶切图; M. DL2000 DNA marker; (a) 1. TAT 基因; 2. GH 基因; 3. TAT-GH 的融合基因; (b) 1. TAT-GH 的融合基因; 2. CP 基因; 3. TGC 融合基因; (c) 1. TGC 基因片段; 2. TGC 表达载体(质粒) 酶切.

图 1 TGC 基因的合成

Fig.1 Gene synthesis of TGC

2.2 获得表达菌株和优化诱导表达条件

将经测序验证正确的重组表达质粒转化到表达菌株 DE3 中 ,获得表达菌株 *Escherichia coli*

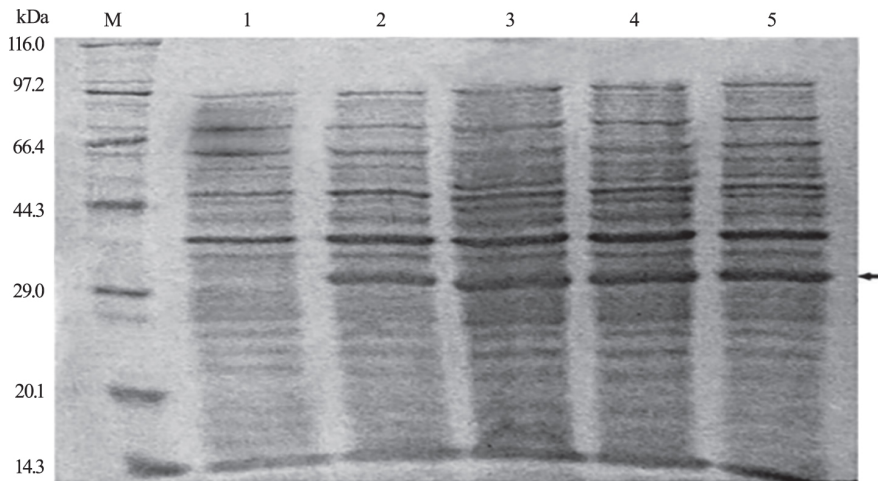
BL21 (DE3) hsdS gal pET-28a-TGC ,简称 TGC-DE3 ,送至中国典型培养物保藏中心进行保藏.保藏号: CCTCC NO: M 2018014.同时 ,实验还研究了不同 IPTG 浓度对 TGC 融合蛋白表达的影响.经

SDS-PAGE 鉴定发现,在不同诱导表达条件下,加入 IPTG 诱导剂后的样品均在标准分子质量 29.0 kDa 的上方产生了一条特异的蛋白条带,与预期蛋白的大小(34.0 kDa)一致,不同 IPTG 诱导条件对应的特异性条带大小不一,而未经 IPTG 诱导的样品中则无目的蛋白条带出现.

2.2.1 IPTG 诱导浓度对重组蛋白表达量的影响

实验设有四个 IPTG 诱导浓度梯度:0.03,

0.05,0.08,0.10 mmol/L,经 Gel-Pro analyzer 软件分析不同诱导浓度对应的特异性条带,结果显示 IPTG 诱导浓度分别为 0.03,0.05,0.08,0.10 mmol/L 的 IOD 值之比为 19:26:25:23,可见当 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L 时 IOD 值占比最高,颜色最深.当诱导浓度超过 0.05 mmol/L 后,随 IPTG 诱导浓度的增加,不同诱导浓度间的 IOD 比值无显著差异(图 2).



M. 蛋白质分子量标准(宽); 1. 未诱导; 2. 0.03 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导; 3. 0.05 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导; 4. 0.08 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导; 5. 0.10 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导.

图 2 不同 IPTG 浓度诱导表达 TGC 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 SDS-PAGE of TGC expression induced by different concentrations of IPTG

2.2.2 IPTG 诱导时间对重组蛋白表达量的影响

实验设有六个时间梯度:0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h,经 Gel-Pro analyzer 软件分析不同诱导时间对应的特异性条带,得到 IPTG 诱导时间分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h 的 IOD 值之比为 6:17:25:24:20:8,可见当诱导时间为 1.5 h 时 IOD 值比值最大,颜色最深,此时 TGC 蛋白表达量最大.诱导 1.5 h 后,IOD 比值随诱导时间的增加而降低,即 TGC 蛋白表达量减少(图 3).

2.2.3 IPTG 诱导转速对重组蛋白表达量的影响

实验设有三个转速梯度:100,200,300 rpm,经 Gel-Pro analyzer 软件分析不同诱导转速对应的特异性条带,得到 IPTG 诱导转速分别为 100,200,300 rpm 的 IOD 值之比为 40:36:23,可见诱导转速为 100 rpm 时,IOD 值比值最大,颜色最深

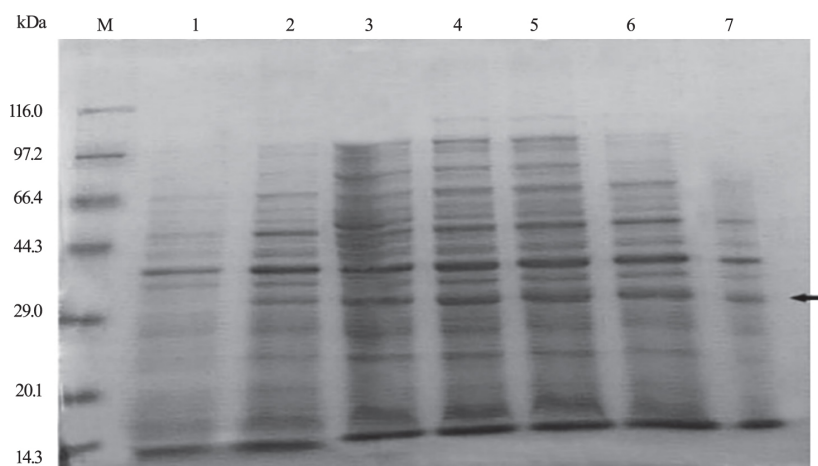
(图 4).

2.2.4 IPTG 诱导温度对重组蛋白表达量的影响

实验设有 5 个温度梯度:25,28,30,33,37 °C,经 Gel-Pro analyzer 软件分析不同诱导温度对应的特异性条带,得到 IPTG 诱导温度分别为 25,28,30,33,37 °C 的 IOD 值之比为 4:10:20:31:35,可见诱导温度为 37 °C 时的 IOD 值比值最大,颜色最深,即 37 °C 下诱导表达的蛋白表达量最大.而低于 37 °C 时,随温度的增加,IOD 比值增加,颜色越深(图 5).

2.2.5 TGC 融合蛋白的表达量

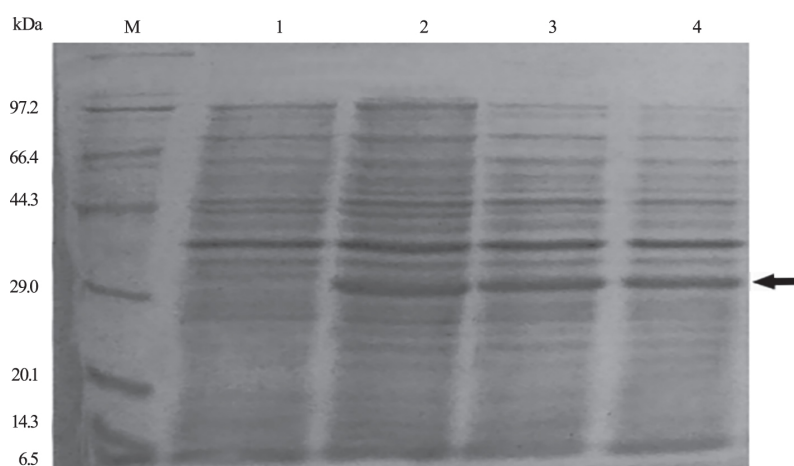
实验比较了 TGC 蛋白在未经诱导下与在优化条件下诱导表达对目的蛋白表达的影响,结果显示在优化条件下出现了明显的特异性条带(图 6).



M. 蛋白质分子量标准(宽); 1. 未诱导; 2. 诱导时间 0.5 h; 3. 诱导时间 1.0 h; 4. 诱导时间 1.5 h; 5. 诱导时间 2.0 h; 6. 诱导时间 2.5 h; 7. 诱导时间 3.0 h.

图3 不同时间下 IPTG 诱导表达 TGC 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

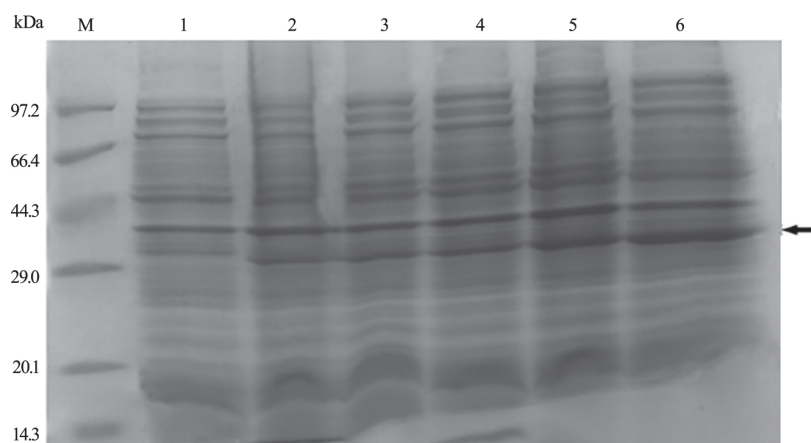
Fig.3 SDS-PAGE of TGC expression induced by IPTG at different time



M. 蛋白质分子量标准(宽); 1. 未诱导; 2. 诱导转速为 100 rpm; 3. 诱导转速为 200 rpm; 4. 诱导转速为 300 rpm.

图4 不同转速下 IPTG 诱导表达 TGC 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

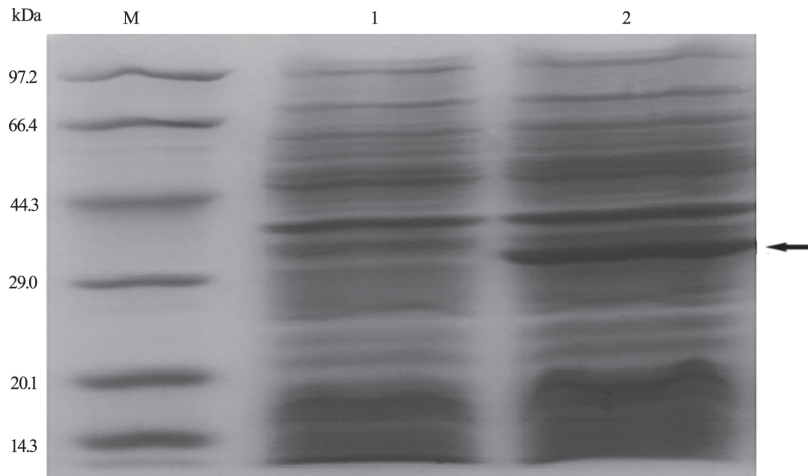
Fig.4 SDS-PAGE of TGC expression induced by IPTG at different rotational speeds



M. 预染蛋白质分子量标准(宽); 1. 未诱导; 2. 诱导温度为 25 °C; 3. 诱导温度为 28 °C; 4. 诱导温度为 30 °C; 5. 诱导温度为 33 °C; 6. 诱导温度为 37 °C.

图5 不同温度下 IPTG 诱导表达 TGC 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.5 SDS-PAGE of TGC expression induced by IPTG at different temperatures



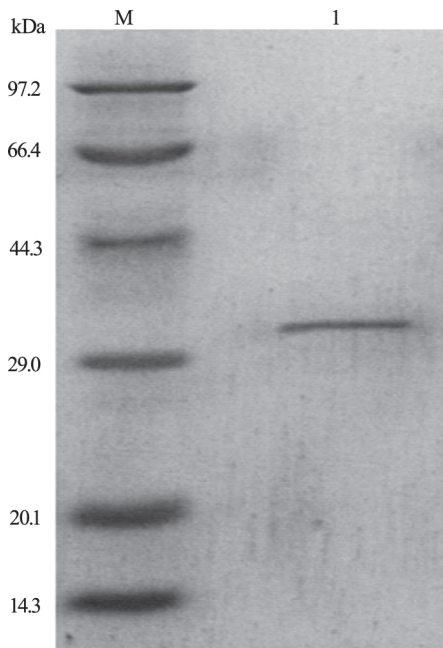
M. 蛋白质分子量标准(宽); 1. 未诱导; 2. 0.05 mmol/L 的 IPTG 在 37 ℃, 100 rpm 条件下诱导 1.5 h.

图 6 IPTG 诱导表达 TGC 蛋白最优条件的 SDS-PAGE 电泳

Fig.6 SDS-PAGE of optimal conditions for IPTG induced expression of TGC

2.3 TGC 蛋白的纯化及其浓度的测定

将纯化后的 TGC 融合蛋白利用 SDS-PAGE 进行检测. 经 SDS-PAGE 鉴定发现, 在标准分子量 29.0 kDa 的上方出现一条蛋白条带, 与预期蛋白的大小(34.0 kDa)一致(图 7). 此外, 利用 BCA 法测定纯化后的 TGC 融合蛋白, 计算得出: 在上述最优诱导表达条件下, 每升菌液中含 TGC 融合蛋白约 2.45 mg.



M. 蛋白质分子量标准(宽); 1. 纯化后的 TGC 蛋白.

图 7 TGC 蛋白的纯化

Fig.7 Purification of TGC protein

3 讨论

3.1 TGC 基因的合成

SOE-PCR 技术能在体外进行有效的基因重组, 且不需内切酶消化和连接酶处理, 可快速获得其它方法难以得到的产物^[13]. 胡功铃和孙长峰利用该技术分别合成出 HMCM 杂合肽基因和可表达出对小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 有抑制效果的杂合抗菌肽基因^[14-15]. 本实验利用 SOE-PCR 和分步扩增技术分别将 *TAT*, *CP* 与 *GH* 基因片段柔性拼接, 几次扩增后产物片段大小均与目的基因片段大小基本相符, 经测序验证, 获得目的基因片段正确. 本研究通过 SOE-PCR 技术, 成功地将 TGC 基因片段柔性拼接成一种新型口服型渔用生长激素基因. 该技术, 也在其他的实验室中被应用, 证明是可靠的^[16-17]. 因此, 利用 SOE-PCR 技术合成 TGC 基因, 具有效率高, 准确性强.

3.2 TGC 蛋白的诱导表达

TGC 表达菌株在 IPTG 诱导浓度高于 0.05 mmol/L 后呈递减趋势, 表明不是 IPTG 诱导浓度越高, 蛋白质的表达量越高. 已有研究表明 IPTG 浓度过高, 会毒害表达宿主菌^[18]. 随诱导表达开启融合蛋白开始少量表达, 1.5 h 后蛋白含量基本稳定, 说明蛋白表达量不随时间的增

加而增加^[19].诱导转速和温度会影响表达菌株的繁殖代谢而影响其诱导表达效率,据实验结果推测在 37 ℃,100 rpm 的条件下更适合表达菌株的生长繁殖,更有利于目的蛋白的诱导表达^[20].鱼类生长激素是以非糖基化形式的蛋白进入血液,含有较少的二硫键且易复性,而大肠杆菌表达系统正适合表达这种无糖基化修饰的蛋白质,该表达系统成熟完善和遗传背景研究较为透彻,是应用最广泛的一种外源蛋白表达系统^[21-22].已有研究者成功将构建的原核表达质粒转化进大肠杆菌 BL21 (DE3) 后能正确、高效地表达目的蛋白^[23-24].本研究构建的 TGC-DE3 在最优诱导表达条件下,每升菌液中可诱导出 TGC 融合蛋白约 2.45 mg,表明经优化后的表达系统,表达效率更高,具有更好的应用前景.本研究提供的口服型重组草鱼生长激素的最佳原核表达条件对口服型渔用生长激素的规模化生产具有一定的参考价值.

参考文献:

- [1] 钱爱东,张冬星,单晓枫.硬骨鱼黏膜表面适应性免疫应答研究进展[J].吉林农业大学学报,2018,40(4):463-470.
- [2] 李德亮,傅萃长,胡炜,等.转生长激素基因鱼的生物能量学研究进展[J].水生生物学报,2010,34(1):204-209.
- [3] CHOI T J,GELETU T T.High level expression and purification of recombinant flounder growth hormone in *E.coli* [J].Journal of Genetic Engineering & Biotechnology,2018,16(2):347-355.
- [4] 周莉,高其双,陈志华,等.TAT 穿膜肽的研究进展[J].当代畜牧,2016(3):34-37.
- [5] 徐咏婷,陈燕,余雳,等.穿膜肽 TAT 和 R9 的生物学效应的体内体外研究[J].激光生物学报,2019,28(4):323-329.
- [6] 谢洋洋,王邵娟,袁权,等.细胞穿膜肽研究应用的新进展[J].生物工程学报,2019,35(7):1162-1173.
- [7] 孔春萌,沈雁,涂家生.细胞穿膜肽的研究进展[J].中国药学杂志,2013,48(14):1143-1146.
- [8] 李创举,单喜双,岳华梅,等.GH 重组蛋白对达氏鲟生长、血液生化 and 体组成的影响[J].水生生物学报,2016,40(6):1106-1113.
- [9] 汤亚方,曾伟伟,王庆,等.草鱼呼肠孤病毒 II 型 VP6 蛋白多克隆抗体制备及其特异性分析[J].淡水渔业,2018,48(1):9-14.
- [10] 陈琳豪,金涛,刘艳妍,等.SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法优化[J].浙江树人大学学报(自然科学版),2014,14(4):20-23.
- [11] 刘林,徐诗英,李婧慧,等.草鱼出血病病毒 VP6 蛋白的原核表达、纯化及免疫效果[J].水产学报,2012,36(3):429-435.
- [12] 李雪娇,赵博,杨帅,等.酶联免疫吸附法与二喹啉甲酸法检测核桃蛋白浓度的比较研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(22):6009-6014.
- [13] XU T,WU Y,WANG W,et al. A Combination Strategy for Construction of Peptide- β 2m-H-2K b Single Chain with Overlap Extension PCR and One-Step Cloning [J].Journal of Microbiology and Biotechnology,2016,26(12):2184-2191.
- [14] 胡功铃.杂合抗菌肽 HMCN 的原核表达及其抗菌活性的初步鉴定[D].重庆:重庆大学,2011.
- [15] 孙长峰,仲维霞,王洪法,等.杂合抗菌肽 Cecropin PI-Dermaseptin S4 在毕赤酵母中的分泌表达及活性鉴定[J].中国病原生物学杂志,2014,9(2):172-176.
- [16] 何嘉怡,王文文,吴京,等.重叠 PCR 法构建嗜酸乳杆菌分选酶 A 基因外源打靶片段[J].宁波大学学报(理工版),2017,30(6):21-27.
- [17] ZHAO C,ZHAO J,WANG W,et al. Expression of MLAA34-HSP70 fusion gene constructed by SOE-PCR [J].Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences,2017,30(3):1125-1127.
- [18] LARENTIS A L,NICOLAU J F,ESTEVEZ GDOS S,et al.Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E.coli* using shaking flasks and microbioreactor [J].BMC Research Notes,2014,7(1):671.
- [19] 余琼,赵丽华,李洪丽,等.IPTG 诱导浓度、时间及温度对重组鲑鱼降钙素与降钙素基因相关肽融合基因表达的影响[J].黑龙江大学自然科学学报,2012,29(2):243-245.
- [20] RIBEIRO VT,ASEVEDO EA,DE PAIVA VASCONCELOS LTC,et al.Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of *Leishmania i.chagasi* expression in *E.coli* M15 [J].Applied Microbiology and Biotechnology,2019:1-10.
- [21] 刘楠.达氏鲟 (*Huso dauricus*) 生长激素基因克隆及原核表达分析[D].大连:大连海洋大学,2015.
- [22] 刘臻,罗小华,鲁双庆,等.鳊 (*Siniperca chuatsi*) 生长激素基因克隆和原核表达[J].海洋与湖沼,2010,41(3):365-370.
- [23] 蔡佳,代礼平,王蓓,等.草鱼 (*Ctenopharyngodon idel-*

lus) *NCCRP-1* 基因的克隆和原核表达 [J]. 生物技术通报, 2013(11): 105-111.

原核表达载体的构建及蛋白表达 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2018, 39(1): 61-67.

[24] 方虹仪, 郭娜, 邢纪斌, 等. 融合蛋白 TAT-RabGEF1

Establishment of Oral Recombinant Growth Hormone Gene of Grass Carp and Its Best Conditions for Prokaryotic Expression

ZHAO Yan, LÜ ruoxuan, CAO Zhichen, ZHU Borun, ZHANG Xinwei, TANG Qingmei, ZHANG Qiusheng

(School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264039, China)

Abstract: Growth hormone is a kind of polypeptide hormone secreted by vertebrates, which can regulate the growth, development and metabolism of fish. In this study, three gene fragments, namely *TAT* (Trans-activating transcriptional activator), *GH* (growth hormone) and *CP* (cyclic peptides), were flexibly spliced into a new type of oral fishing with growth hormone gene (*TGC*) and its prokaryotic expression vector was constructed, which was then transformed into the expression strain *Escherichia coli* BL21 (DE3). *TGC-DE3* was obtained and the conditions for prokaryotic expression of *TGC-DE3* were optimized. The results showed that the *TGC* gene fragments obtained after flexible splicing were completed and positively integrated into the expression vector, and the engineered strain of *TGC-DE3* gene could induce the expression of the target protein with a molecular weight of about 34.0 kDa. When IPTG concentration was 0.05 mmol/L, the induction temperature was 37 °C, the induction speed was 100 rpm, and the optimal induction time was 1.5 h, the expression of the target protein was the highest. This study provided a possibility for the use of growth hormone for fishing from injection to oral administration, and also provided technical support for the large-scale prokaryotic expression production of oral grass carp growth hormone protein.

Keywords: recombinant growth hormone; prokaryotic expression; trans-activating transcriptional activator; cell penetrating cyclic peptide

(责任编辑 李维卫)