

日本鳗鲡黄体生成素在毕氏酵母中的表达

黄名锡^{1,2,3}, 戴荣贵^{1,2,3}, 陈磊^{1,2,3}, 王梦洋^{1,2,3}, 谢仰杰^{1,2,3}, 陈天圣^{1,2,3}

(1. 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

3. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的人工繁育技术尚未解决, 其重要原因是饲养条件下鳗鲡性腺不能发育成熟。黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 是促性腺激素的主要成分。为了解黄体生成素的功能, 利用毕氏酵母生产具有生物活性的重组日本鳗鲡黄体生成素, 构建了 *LHB* 和 *GTH α* 亚基 cDNA 串联的 669 bp 的真核表达载体, 通过转化 X-33 酵母菌株, 成功表达了日本鳗鲡黄体生成素重组蛋白。重组蛋白糖基化后相对分子质量为 45 ~ 75 ku, 经过 *N*-糖苷酶 (glycopeptidase F) 去糖基化后蛋白呈现单一条带, 且相对分子质量与理论大小相符。在 0.5% 甲醇诱导下, 96 h 重组蛋白表达量最高, 纯化后可获得 3 ~ 4 mg/L 的蛋白量。

[关键词] 日本鳗鲡; 黄体生成素; 重组蛋白; 酵母表达

[中图分类号] S 961

Expression of Recombinant Follicle Stimulating Hormone of Japanese Eel *Anguilla japonica* Using *Pichia pastoris*

HUANG Mingxi^{1,2,3}, DAI Ronggui^{1,2,3}, CHEN Lei^{1,2,3}, WANG Mengyang^{1,2,3},

XIE Yangjie^{1,2,3}, CHEN Tiansheng^{1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Xiamen 361021, China; 2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

Abstract: A key hurdle is the failure of eel gonads to mature under artificial feeding conditions, linked closely to the production and secretion of gonadotropins. Among these, luteinizing hormone (LH) plays a pivotal role. To unravel the role of Japanese eel LH, biologically active recombinant LH was synthesized using *Pichia pastoris*. The recombinant Japanese eel LH was successfully expressed by transforming the X-33 yeast strain with a 669 bp expression vector containing *LHB* and *GTH α* subunit cDNA. The protein exhibited a molecular weight ranging from 45 ku to 75 ku. Following deglycosylation with glycopeptidase F enzyme, the protein displayed a single band around 25 ku, aligning with the anticipated size. Optimal expression, peaking at 96 hours with 0.5% methanol induction, yielded purified protein at concentrations of 3-4 mg/L.

Keywords: Japanese eel; luteinizing hormone; recombinant protein; yeast expression

[收稿日期] 2023-12-30

[基金项目] 福建省自然科学基金项目“海水驯养对鳗鲡卵巢发育的影响及分子机理”(2023J01145); 福建省自然科学基金项目“鳗鲡促卵泡生产激素 FSH 的表达和功能分析”(2024J01104); 集美大学科学研究基金项目“基因编辑在青鳉分子抗病育种的研究”(ZQ2020003)

[作者简介] 通信作者: 谢仰杰 (1967—), 博士, 教授, 从事鱼虾类人工繁育和遗传育种研究。通信作者: 陈天圣 (1977—), 博士, 教授, 从事鱼类分子育种研究。E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn

0 引言

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 俗称河鳗, 隶属硬骨鱼纲鳗鲡目鳗鲡科鳗鲡属, 属降河产卵型洄游性鱼类, 广泛分布于日本北海道至菲律宾之间的西太平洋及相关淡水水域, 是东亚地区重要的食用鱼类。由于其特殊的繁殖习性, 人工繁育技术尚不成熟, 人工养殖的鳗苗全部依赖于野外捕捞, 而野生资源因受生存环境破坏的影响几近枯竭^[1]。开展人工繁育技术研究是解决苗种资源短缺的根本途径, 但无论是人工养殖的还是野外捕获的鳗鲡都不能达到性成熟^[2], 需要注射外源的性激素。虽然使用外源促性腺激素 (gonadotropic hormone, GTH), 如人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, HCG) 和鲑鱼脑垂体提取物, 可以促进鳗鱼的性腺发育^[3-4], 但是, 由于异源 GTH 或其等价物不能完全替代本物种 GTH 的必需部分, 所以使用异源 GTH 并不能稳定地获得优质的完全成熟的卵子^[5]。利用来自日本鳗鲡的 GTH 进行催熟, 可能比其他物种来源的性激素更有效。日本鳗鲡自身的 GTH 含量极低, 难于分离纯化。因而, 利用生物技术大量生产日本鳗鲡重组促性腺激素 (GTH) 蛋白, 并用于日本鳗鲡的人工催熟和催产, 对于日本鳗鲡人工繁殖深入研究具有重要的意义。

多数硬骨鱼类的生殖过程是在下丘脑、脑垂体、性腺组成的神经与内分泌系统 (也称下丘脑—垂体—性腺轴 (hypothalamus-pituitary-gonadal axis, HPG 轴) 的整体控制下进行的^[6]。GTH 是 HPG 轴中的关键作用因子, 具有调控性腺发育、成熟和排精排卵的功能。研究表明: 日本鳗鲡卵泡刺激素 (FSH) 能诱导未成熟雄性鳗鲡分泌雄激素促进精巢发育^[7-8], 黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 能促进卵母细胞发育成熟^[9]。LH 是由异源二聚体 GTH α 和 LH β 两个亚基组成的糖蛋白激素, 亚基的分离会影响异源二聚体蛋白的生物活性^[10]。为了研究鱼类 LH 的功能, 通过表达重组蛋白是有效的方法。已有多种表达系统用于表达鱼类黄体生成素的重组蛋白^[7,11-12]。酵母表达系统操作技术简单, 成本不高, 能进行许多真核蛋白翻译后的修饰, 而且有望获得适合表达蛋白的结构和高产重组蛋白^[13-14]。因此, 本研究拟构建毕氏酵母表达载体, 在毕氏酵母甲基营养菌株 X-33 中表达日本鳗鲡 LH 重组蛋白, 为后续的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

毕氏酵母 X-33 菌株购自爱科博生物公司; pPICZ(α)A 购自南京金斯瑞公司; 通用型 RNA 提取试剂盒购自爱科瑞生物公司; 质粒提取试剂盒、液体回收试剂盒购自 Omega 公司; *EcoR* I、*Sal* I、*Sac* I 等内切酶购自 NEB 公司; His-Tag、羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的二抗购自 ABclone 公司; 镍柱亲和层析填料 (Ni Sepharose 6 Fast Flow) 购自 Cytiva 公司; PVDF 膜、“Quick Start” Bradford 蛋白测定试剂 (Quick Start Bradford 1 \times Dye Reagent) 购自 BIO-RAD 公司。PCR 引物合成和 DNA 测序由上海生物工程有限公司完成。25 μ g/mL Zeocin 低盐 LB 液体/固体培养基、YPD 液体/固体培养基、YPD-DS 固体培养基、MGY 培养基、MM 培养基的配方见 Invitrogen 公司酵母表达手册中的说明。

1.2 鳗鲡垂体 cDNA 的制备

鳗鲡垂体组织采集于人工养殖 2 年左右的日本鳗鲡, 体重 (700 \pm 10) g, 全长 (70 \pm 1) cm, 体质健康无伤病。使用通用型 RNA 提取试剂盒, 按照说明书提取鳗鲡垂体 RNA。将提取的垂体 RNA, 按照 cDNA 合成试剂盒的说明, 制备鳗鲡垂体 cDNA, 样品保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.3 LH β 、GTH α 序列的获取

根据 NCBI 数据库中日本鳗鲡 GTH- α 亚基 (登录号: AB175834.1)、LH- β 亚基 (登录号: AB175835.1) 的 cDNA 序列分别设计 PCR 引物 GTH α -F、GTH α -R、LH β -F、LH β -R (见表 1), 扩增 GTH α 、LH β 亚基去除终止密码子的成熟肽区域。LH β -F、GTH α -R 中分别引入 *EcoR* I 和 *Sal* I 位点与 pPICZ(α)A 同源臂序列; LH β -R 中引入 GTH α 片段前 20 bp 序列 (见表 1)。以日本鳗鲡垂体 cDNA 为模板, 用 LH β -F、LH β -R、GTH α -F、GTH α -R 为引物进行 PCR 扩增, 分别扩增 LH β 、GTH α 亚基, 扩增片

段通过切胶纯化回收, 测定浓度后置于 -20 ℃ 保存。

表 1 本研究所用引物表
Tab.1 Primers used in this study

引物名称	碱基序列(5' - 3')	用途
GTH α -F	tatcccaacaacgaaatg	GTH α ORF 扩增
GTH α -R	atgatgatgatggtcgacaaattgtgtagtagca	GTH α ORF 扩增
LH β -F	agagaggctgaagctgaattcttactgctgcctgtgag	LH β ORF 扩增
LH β -R	gccatttcgttgtgggatacgcggggaggetggcccg	LH β ORF 扩增
5'AOX1	gactggttccaattgacaagc	pPICZ(α) A 通用引物
3'AOX1	gcaaatggcattctgacatcc	pPICZ(α) A 通用引物

1.4 LH β 、GTH α 序列连接

用高保真酶进行重叠 PCR, 将 LH β 、GTH α 亚基连接。以纯化的 GTH α 、LH β 片段互为模板和引物进行第一轮 PCR; 以第一轮 PCR 产物为模板, 以 LH β -F、GTH α -R 为引物进行第二轮 PCR, 将第二轮 PCR 产物命名为 LH $\beta\alpha$ 。切胶回收目的电泳条带 DNA (预计 669 bp), 测定浓度后置于 -20 ℃ 保存。

1.5 LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A 表达载体构建

将 LH $\beta\alpha$ 与 pPICZ(α) A 载体连接。用 *Eco*R I 和 *Sal* I 内切酶对 pPICZ(α) A 质粒进行酶切, 切胶回收 pPICZ(α) A 骨架片段。用无缝克隆 (infusion) 的方式将 LH $\beta\alpha$ 片段和 pPICZ(α) A 骨架于 37 ℃ 连接 30 min, 连接产物转化 DH5a 感受态细胞, 涂布于 25 μ g/mL Zeocin 的低盐 LB 平板上, 于 37 ℃ 孵育过夜。挑选单克隆进行 PCR 验证, 并对验证正确的单克隆扩大培养, 质粒提取后使用 *Eco*R I、*Sal* I 及 *Sac* I、*Afe* I 两组酶分别进行酶切验证, 并将质粒送至上海生工生物工程有限公司测序。将测序正确的质粒命名为 LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A。

1.6 重组日本鳗鲡 LH (LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A) 的表达

1) 转化。用质粒提取试剂盒大量制备 LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A 质粒。用 *Sac* I -HF 内切酶 37 ℃ 静置 4 h 线性化 20 μ g LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A 质粒, 通过琼脂糖凝胶电泳验证质粒的线性化。液体回收后将纯化的质粒 (约 10 μ g) 电击转化到新制备的毕氏酵母 X-33 感受态细胞, 使用 MicroPulser 电穿孔仪 (BIO-RAD) 进行电击 (1500 V、25 μ F、200 Ω 、4.3 ms)。电击后的产物涂布于含 300 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 平板上, 于 29 ℃ 培养 3 d。

2) 重组子筛选。在含有 Zeocin 的 YPDS 平板上挑选 3 个菌落较大的单克隆, 放入 YPD 培养基中, 于 29 ℃ 培养 16 h 后取 1 mL 菌液, 用微波法^[15]提取酵母基因组 DNA。以提取的酵母基因组 DNA 为模板, 用酵母的通用引物 (5'AOX1、3'AOX1) 和目的片段的特异引物 (LH β -F、GTH α -R) 进行 PCR 扩增, 并验证 LH $\beta\alpha$ 目的序列是否成功电转进入酵母 X-33, 将验证正确的重组子命名为 LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A-X33。

3) 重组菌的表达发酵。将含有 LH $\beta\alpha$ -pPICZ(α) A-X33 的 YPD 菌液按 1% 体积分数接种到 MGY 培养液中, 于 29 ℃ 过夜培养至 OD₆₀₀ 为 2 ~ 6, 离心去上清液, 使用 MM 培养基重悬浮沉淀, 每隔 24 h 加入甲醇至终体积分数为 0.5%, 在 29 ℃ 下诱导表达 4 d, 然后采用蛋白电泳和蛋白杂交检测目的片段的表达。

4) 重组菌优化表达。选择表达量高的重组子, 按照前面所述表达发酵方法, 表达发酵 96 h, 每隔 24 h 取样, 检测 LH $\beta\alpha$ 蛋白表达的最优时间。

5) SDS-PAGE 和 Western-blot 检测。用 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测上清液中的表达产物。SDS-PAGE 胶用考马斯亮蓝染色。Western-blot 检测时, 将 SDS-PAGE 胶、PVDF 膜、转膜滤纸置于转膜仪中, 呈三明治结构, 在 17 V 的电压下, 转膜 25 min。转膜后使用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的

TBST 溶液)，在水平摇床上，室温封闭 PVDF 膜 1 h，TBST 洗膜 15 min。以 His-Tag 为一抗，体积比为 1:1000，4 ℃ 摇床孵育过夜；洗膜 30 min；二抗用羊抗鼠 IgG 作标记，体积比为 1:5000，室温摇床孵育 1 h；洗膜 60 min。最后将 PVDF 膜置于化学发光仪上进行 ECL 显色。

6) LHβ α 蛋白去糖基化。将酵母表达的 LHβ α 蛋白 25 μ g 浓缩后加入变性缓冲液，100 ℃ 加热 3 min，接着加入 1 mU Glycopeptidase F 酶（Takara），混合均匀后，于 37 ℃ 静置 20 h，然后将上述反应液用于蛋白电泳和蛋白杂交分析。

7) LHβ α 蛋白纯化。用柱层析法纯化目的蛋白。取表达发酵 4 d 的酵母发酵液的上清液 100 mL，缓慢加入 5 mol/L 的 NaOH 调整 pH 值到 6.8，上清液经过 0.45 μ m 的滤膜过滤后，加入 NI 柱亲和填料于 4 ℃ 过夜结合。用含 20 mmol/L 咪唑的洗涤缓存液（20 mmol/L 磷酸钠、0.5 mol/L 氯化钠、20 mmol/L 咪唑）5 mL 洗去杂蛋白，用含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液（20 mmol/L 磷酸钠、0.5 mol/L 氯化钠、500 mmol/L 咪唑）5 mL 洗脱目的蛋白，再用 Quick Start Bradford 1 \times Dye Reagent 试剂初步检测蛋白洗涤及洗脱效果，纯化结束后用考马斯亮蓝染色和 Western-blot 检测蛋白纯化效果。

8) LHβ α 蛋白质量浓度测定。用 PBS 稀释 BSA 标准品（2 mg/mL），配制成不同浓度的 BSA 溶液。向不同浓度的 BSA 溶液中分别加入 200 μ L Quick Start Bradford 1 \times Dye Reagent 试剂，混合均匀后，用酶标仪测定 595 nm 处吸光度值并绘制标准曲线。根据待测样品吸光度值从标准曲线上计算出纯化液中 LHβ α 蛋白的质量浓度。所有实验进行三次重复，取其平均值。

2 结果

2.1 LHβ、GTH α 亚基片段的扩增及序列连接

以日本鳗鲡垂体 cDNA 为模板，以 LHβ-F、LHβ-R、GTH α -F、GTH α -R 为引物进行 PCR 扩增（见图 1a），扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示，扩增片段长度均与预期结果一致。根据已知序列得产物 LHβ 片段大小为 389 bp，GTH α 片段大小为 300 bp（见图 1b）；重叠 PCR 将 LHβ、GTH α 亚基序列成功连接，连接后的扩增序列（LHβ α ）长 669 bp（见图 1c）。

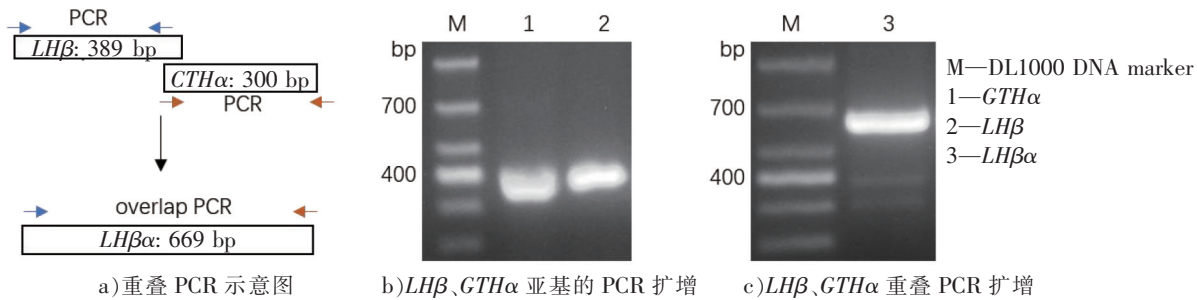


图 1 LHβ α 基因片段的 PCR 扩增电泳图

Fig.1 Electropherogram of LHβ α gene fragment by PCR amplification

2.2 LHβ α -pPICZ(α)A 重组质粒的构建与鉴定

以 pPICZ(α)A 为骨架，用内切酶 *Eco*R I 和 *Sal* I 将载体切开，然后插入 LHβ α 基因片段构建重组载体 LHβ α -pPICZ(α)A（见图 2a）。使用引物 LHβ-F、GTH α -R 对提取的 LHβ α -pPICZ(α)A 质粒进行 PCR 验证，琼脂糖凝胶电泳显示出与目的片段大小一致的片段（669 bp）（见图 2b）；使用 *Eco*R I、*Sal* I 内切酶对 LHβ α -pPICZ(α)A 质粒进行酶切验证，产物经琼脂糖凝胶电泳获得 3 条带，预期大小分别为 3487、412、239 bp（见图 2c 泳道 2）。使用 *Sac* I、*Afe* I 内切酶对质粒进行酶切验证，电泳获得两条预期大小的条带分别为 2689、1499 bp（见图 2c 泳道 3）。质粒测序结果也表明 LHβ α -pPICZ(α)A 构建成功。

2.3 重组子筛选

琼脂糖凝胶电泳所得条带的 DNA 片段大小与预期结果一致（669 和 1116 bp，见图 3），说明

LHβα-pPICZ(α)A 重组质粒已成功整合至酵母基因组 DNA 中。

2.4 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测目的蛋白

将发酵 4 d 的酵母液用于 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。考马斯亮蓝染色和 Western-blot 检测结果显示, his-tag 标签抗体成功在 45 ~ 75 ku 区间杂交到蛋白, 且呈现弥散拖尾现象, 3 号克隆表达量最高, 2 号克隆不表达 (见图 4)。

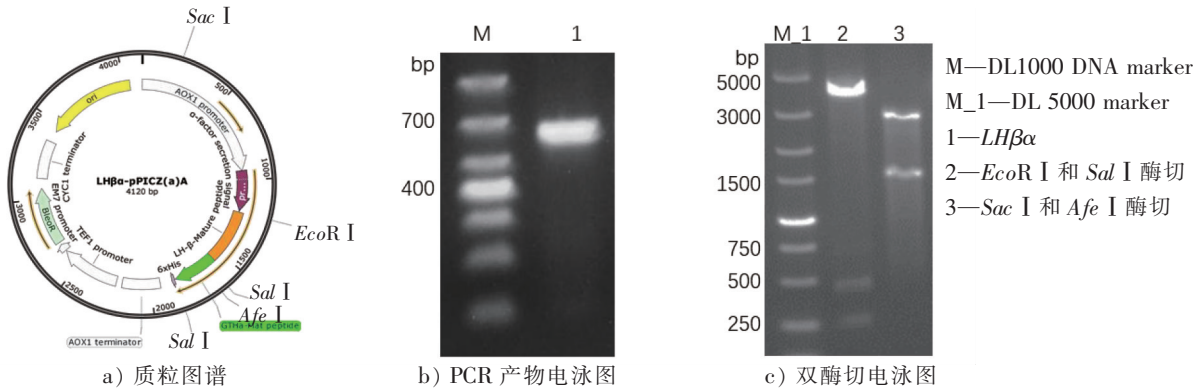


图 2 LHβα-pPICZ(α)A 质粒图谱和验证结果
Fig.2 Map and validation results of plasmid LHβα-pPICZ(α)A

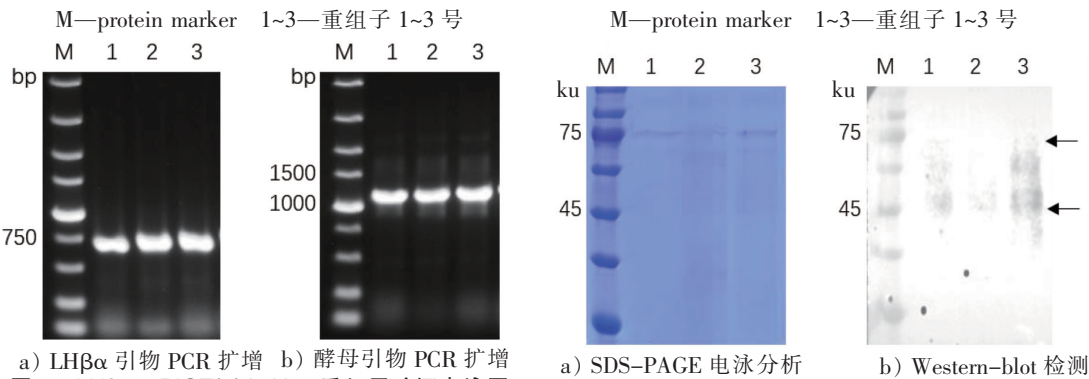


图 3 LHβα-pPICZ(α)A-X33 重组子验证电泳图
Fig.3 Electropherogram of verification of LHβα-pPICZ(α)A-X33 recombinant

图 4 LHβα 蛋白表达验证
Fig.4 Verification of LHβα protein expression

2.5 LHβα 蛋白去糖基化

用 Glycopeptidase F 酶在 37 °C 下处理纯化的 LHβα 蛋白 20 h。电泳结果显示: 没有经过 Glycopeptidase F 处理的 LHβα 蛋白呈现弥散状态, 杂交后富集在 45 ~ 75 ku (见图 5 泳道 1); 通过去糖基化, LHβα 蛋白 N-糖苷键被成功切断, 蛋白弥散拖带的情况明显减少 (见图 5 泳道 2), 酶切后 LHβα 蛋白大小与理论大小相符合 (25.14 ku), 而且杂交信号大幅度增加。

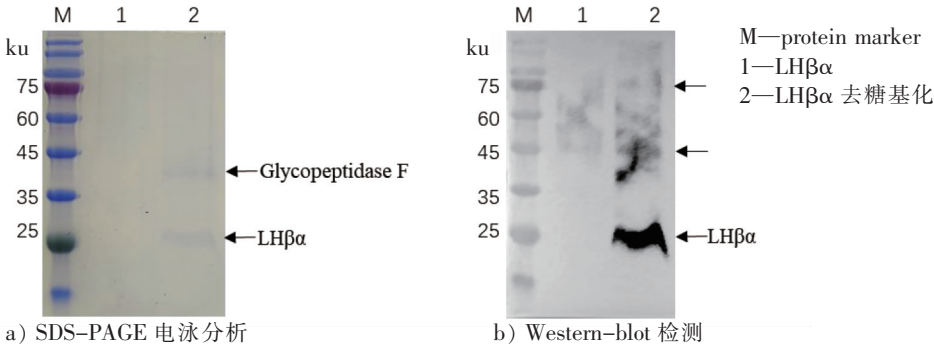


图 5 LHβα 蛋白去糖基化验证
Fig.5 Verification of de-glycosylated LHβα

2.6 LHβα 蛋白表达时间优化

选择表达量高的 3 号重组酵母菌，在甲醇终体积分数为 0.5% 的条件下，诱导表达 96 h，每隔 24 h 取样用于 SDS-PAGE 检测，结果（见图 6）显示 LHβα 蛋白表达量在诱导 96 h 时达到峰值。

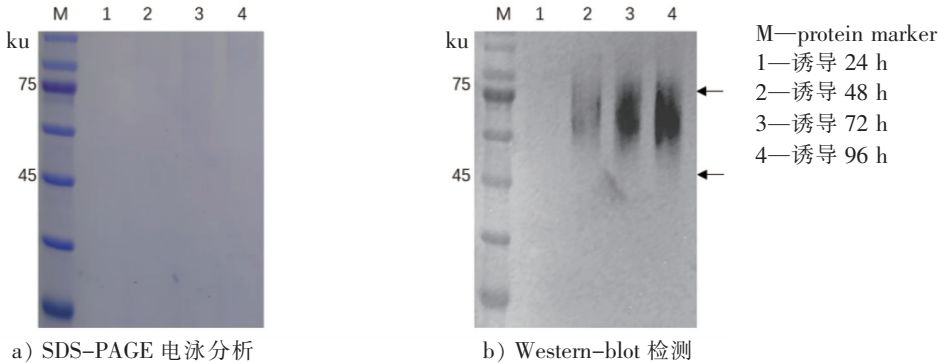


图 6 LHβα 蛋白诱导时间优化验证
Fig.6 Optimization verification of protein induction time

2.7 LHβα 蛋白纯化

将纯化后的 LHβα 蛋白用于 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。尽管考马斯亮蓝染色几乎看不到 LHβα 蛋白条带，但是 Western-blot 结果显示，柱层析法能够从酵母发酵液的上清液中浓缩和纯化到 LHβα 蛋白。未经纯化的上清液只能检测到少量 LHβα 蛋白（见图 7b 泳道 1），穿流液（见图 7b 泳道 2）和洗涤液（见图 7b 泳道 3）中没有检测到 LHβα 蛋白，目的蛋白大部分富集在第三次洗脱液（见图 7b 泳道 5）中。

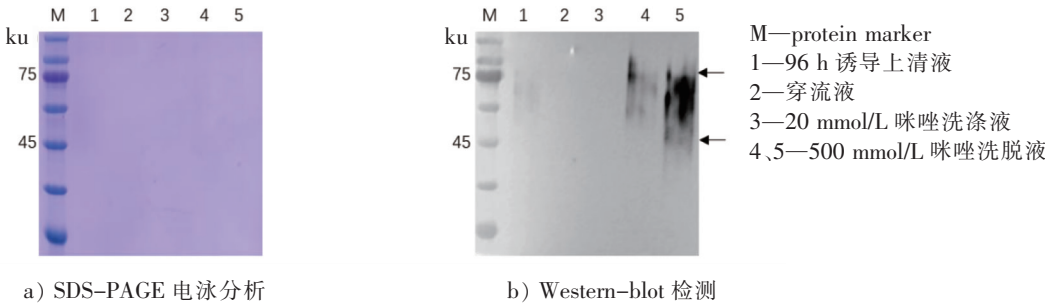


图 7 LHβα 蛋白纯化验证
Fig.7 Verification of LHβα protein purification

2.8 LHβα 蛋白质量浓度测定

采用 BSA 法对 LHβα 蛋白进行质量浓度测定，获得 LHβα 蛋白 595 nm 下的吸光度值，进而绘制出 LHβα 蛋白标准曲线（如图 8 所示），经过计算，5 mL 纯化液中 LHβα 蛋白质量浓度为 0.08 mg/mL。因此，从 100 mL 的培养液中最终获得 400 μg 纯化的 LHβα 蛋白。

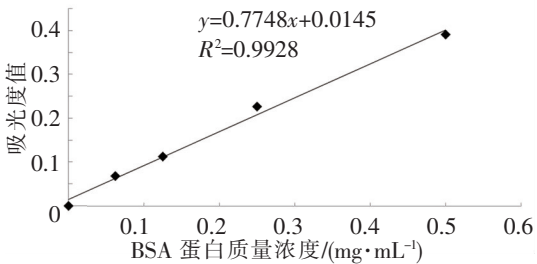


Fig.8 Protein standard curve

3 讨论

目前，酵母表达系统已被广泛应用于重组外源蛋白的生产，因其不仅操作便利、生产成本低，还具有蛋白质加工、折叠和翻译后修饰的能力^[16]。另一方面，穿梭质粒 pPICZ(α)A、pPIC9K 等不仅含有多个多克隆位点，便于目的序列的插入，而且该载体在多克隆位点的上游引入一段来源于酿酒酵母 α 因子的分泌信号序列^[17]，具有强分泌能力，能将研究的目的蛋白分泌到培养基中，便于蛋白质收集及纯化。毛黎敏等^[18]以 pPICZ(α)A 为载体，插入接头序列（GS×3）连接的花鳃鲷 LHβ 和 GTHα

亚基,并成功在毕氏酵母 X33 菌株中分泌表达;Kamei 等^[7]使用同时表达策略,在 pPIC9K 中插入独立表达日本鳎鲷 *FSH β* 和 *GTH α* 亚基的转录单元,在毕氏酵母 KM71 菌株中成功表达具有体外生物学活性的两个亚基的融合蛋白;Chen 等^[19]将两个分别表达点带石斑鱼 *GTH α* 和 *FSH β* 亚基的 pPICZ(α) A 载体共转化酵母 X33 菌株,成功表达二聚体形式的 FSH 蛋白。可见,对于结构相对复杂的促性腺激素蛋白,通过酵母表达系统能够将其正确表达、加工与分泌,这为重组促性腺激素的表达提供了平台。

在本研究中,使用 His 标签抗体,通过 Western-blot 检测 LH 重组蛋白的表达。结果表明:LH 重组蛋白成功分泌到酵母培养基中,在 45 ~ 75 ku 区间内检测到蛋白,但是蛋白杂交信号弱,且呈现弥散拖尾现象。经分析发现,*LH β* 基因片段和 *GTH α* 基因片段中共含有 3 个糖基化位点。鉴于酵母表达系统具备翻译后修饰的能力,能够对具有糖基化位点的蛋白进行糖基化修饰,因此,推测在表达 *LH $\beta\alpha$* 融合基因片段的过程中,进行了糖基化修饰过程,而糖部分的不同构象可以改变与电泳凝胶的相互作用或与 SDS 结合的程度,最终导致电泳行为不能正确反映相应蛋白的大小^[20]。所以,*LH $\beta\alpha$* 重组蛋白的实际大小不能确定,条带呈现弥散状态,大部分蛋白集中在 45 ~ 75 ku 之间。在使用 Glyco-peptidase F 酶对 LH 蛋白去 *N*-糖基化处理后,蛋白呈现单一条带,且蛋白大小与预期结果 (25.14 ku) 相符,这与其他人已经报道的,糖基化后改变蛋白大小的研究结果^[21-23]一致。有研究^[24]表明,LH 蛋白中 α 和 β 亚基之间的非共价连接对于生物活性是非必须的,且单链的分泌更类似异源二聚体的分泌方式。本实验通过重叠 PCR 技术融合日本鳎鲷 *LH β* 和 *GTH α* 两个亚基为一条单链的形式,在毕氏酵母中成功分泌表达 LH 重组蛋白。使用镍柱亲和层析填料能够将 LH 蛋白从酵母表达的上清液中分离纯化。本实验中发现,酵母表达的上清液的 pH 值在 1 ~ 2 之间,不能被镍柱亲和层析填料吸附,通过调整溶液的 pH 值到中性 6.8,蛋白才能被吸附和纯化。根据纯化的 *LH $\beta\alpha$* 蛋白的初步数据计算,能够在 100 mL 酵母发酵液上清中获得 0.4 mg *LH β* 重组蛋白。因此,合理推测,本研究构建的酵母表达系统表达 LH,蛋白产量为 3 ~ 4 mg/L,该产量与其他人的研究结果^[25-27]接近。本研究后续实验中将对表达条件进行优化,以提高 LH 蛋白的产量。

综上所述,本研究使用毕氏酵母表达系统成功表达日本鳎鲷黄体生成素 LH,为下一步功能和活性等方面的研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] TSUKAMOTO K, AOYAMA J, MILLER M. Present status of the Japanese eel; resources and recent research[J]. American Fisheries Society Symposium, 2009, 58: 21-35.
- [2] KAGAWA H, TANAKA H, OHTA H, et al. The first success of glass eel production in the world; basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture[J]. Fish Physiol Biochem, 2005, 31 (2/3): 193-199.
- [3] YAMAMOTO K, YAMAUCHI K. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium[J]. Nature, 1974, 251 (5472): 220-222.
- [4] SATO N, KAWAZOE I, SUZUKI Y, et al. Adequate interval of sGTH administration to induce vitellogenesis, and induction of ovulation by simultaneous administration of sGTH and 17 α -hydroxyprogesterone in the Japanese eel[J]. Fish Sci, 2000, 66 (4): 644-654.
- [5] KAGAWA H. Artificial induction of oocyte maturation and ovulation[M]//AIDA K, TSUKAMOTO K, YAMAUCHI K. Eel Biology. Tokyo: Springer-Verlag, 2003: 401-414.
- [6] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999.
- [7] KAMEI H, OHIRA T, YOSHIURA Y, et al. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 134 (3): 244-254.
- [8] KAMEI H, KAWAZOE I, KANEKO T, et al. Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its biochemical properties and steroidogenic activities[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 143 (3): 257-266.
- [9] HAN Y S, LIAO I C, HUANG Y S, et al. Profiles of PGH- α , GTH I- β , and GTH II- β mRNA transcript levels at different ovarian stages in the wild female Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 133 (1): 8-16.

- [10] KASUTO H, LEVAVI-SIVAN B. Production of biologically active tethered tilapia LH β α by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 140(3): 222-232.
- [11] ELIZUR A, ZMORA N, MEIRI I, et al. Gonadotropins: from genes to recombinant proteins[C]//International Marine Biotechnology Conference. Australia: Australian Institute of Marine Sciences, 2000.
- [12] HUANG C J, HUANG F L, CHANG G D, et al. Expression of two forms of carp gonadotropin α subunit in insect cells by recombinant baculovirus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(17): 7486-7490.
- [13] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45-66.
- [14] SUDBERY P E. The expression of recombinant proteins in yeasts[J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7(5): 517-524.
- [15] GOODWIN D, LEE S. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR[J]. Biotechniques, 1993, 15(3): 438, 441-442, 444.
- [16] 朱泰承, 李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6): 929-938.
- [17] CREGG J M, VEDVICK T S, RASCHKE W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*[J]. Nat Biotechnol, 1993, 11(8): 905-910.
- [18] 毛黎敏, 张勇, 李阳源, 等. 花鳉重组促黄体生成素在毕赤酵母中的表达[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(2): 86-90.
- [19] CHEN J, ZHANG Y, TANG Z, et al. Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) follicle-stimulating hormone (FSH) in single-chain form and dimer form by *Pichia pastoris* and their biological activities[J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 178(2): 237-249.
- [20] DURCHSCHLAG H, CHRISTL R, JAENICKE R. Comparative determination of the particle weight of glycoproteins by SDS-PAGE and analytical ultracentrifugation[M]//BORCHARD W. Progress in Analytical Ultracentrifugation: Progress in Colloid & Polymer Science. [S. l.]: Steinkopff, 1991, 86: 41-56.
- [21] 梁启星, 石竟成, 金学荣, 等. 肠激酶在毕赤酵母中的分泌表达优化[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1689-1698.
- [22] YANG M, YU X W, ZHENG H Y, et al. Role of *N*-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 1-14.
- [23] WANG Z, GUO C, LIU L, et al. Effects of *N*-glycosylation on the biochemical properties of recombinant bEK_L expressed in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme Microb Technol, 2018, 114: 40-47.
- [24] SUGAHARA T, PIXLEY M R, MINAMI S, et al. Biosynthesis of a biologically active single peptide chain containing the human common α and chorionic gonadotropin β subunits in tandem[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(6): 2041-2045.
- [25] KAZETO Y, KOHARA M, MIURA T, et al. Japanese eel follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH): production of biologically active recombinant FSH and LH by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology[J]. Biol Reprod, 2008, 79(5): 938-946.
- [26] KAZETO Y, ITO R, SUZUKI H, et al. Establishment of cell-lines stably expressing recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone using CHO-DG44 cells: fully induced ovarian development at different modes[J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1201250.
- [27] KAZETO Y, SUZUKI H, OZAKI Y, et al. C-terminal peptide (HCTP) of human chorionic gonadotropin enhances *in vivo* biological activity of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone produced in FreeStyle 293-F cell lines[J]. Gen Comp Endocrinol, 2021, 306: 113731.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)