

斜带石斑鱼 PACAP 的原核表达及活性分析*

江 1,2 李文笙^{1,3} 林浩然^{1,3**}

1. 中山大学生命科学学院/水生经济动物研究所, 广州 510275

2. 广州中医药大学, 广州 510405

3. 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275

The prokaryotic expression and biological activity of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in groupers *Epinephelus coioides* *

JIANG Yong^{1,2}, LI Wen-Sheng^{1,3}, LIN Hao-Ran^{1,3**}

1. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China

2. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510275, China

3. Key Laboratory of Aquatic Economic Animals for Breeding and Reproduction, Guangdong Province, Guangzhou 510275, China

Abstract The objective of this study is to produce biologically active grouper recombinant pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). The cDNA encoding the mature grouper PACAP was isolated by RT-PCR using total RNA extracted from grouper brain. The expression plasmid pTRX-PACAP was constructed by inserting PACAP cDNA into plasmid pTRX and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). An expression strain BL21 (DE3)-pTRX-PACAP was selected. SDS-PAGE analysis revealed that the grouper PACAP protein was highly expressed and accumulated up to above 25% of the total bacterial proteins, which is present both in inclusion bodies and in soluble form. The soluble PACAP accounts for above 40%. After Ni²⁺-chelation affinity chromatography, the purified protein has a purity of over 95%. Purified PACAP protein could significantly promote the secretion of growth hormone (GH) from hyphathelamas and pituitary mixture incubation [*Acta Zoologica Sinica* 51 (6): 1162–1166, 2005].

Key words Grouper, *Epinephelus coioides*, PACAP, Prokaryotic expression, Growth hormone

关键词 斜带石斑鱼 PACAP 重组表达 生长激素

自 1989 年从绵羊下丘脑提取物发现垂体腺苷酸环化酶激活多肽 (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) 以来 (Miyata et al., 1989), 已证明它能促进垂体激素释放, 同时还具有神经递质、神经调质和神经营养等作用, 使对 PACAP 的研究成为十分活跃的领域。PACAP 属于血管活性肠肽 (VIP) - 胰高血糖素 - 生长激素释放因子 - 分泌素家族 (Campbell and Scanes, 1992) 成员, 已鉴别出包含 27 和 38 个氨基酸两种类型。对原索动物 (McRory et al., 1997)、两栖类 (蛙)

(Alexandre et al., 2000)、爬行类 (蜥蜴) (Pohl and Wank, 1998)、鸟类 (鸡) (McRory et al., 1997)、啮齿类 (鼠) (Ghatei et al., 1993) 等脊椎动物 PACAP 的研究多集中在结构与进化方面, 对功能了解甚少。

对鱼类 PACAP 的研究表明, 它出现在脑 - 脑垂体轴, 能调节垂体激素的分泌活动 (Cai et al., 1997), 尤其是它能同时促进鱼类生长激素 (Growth hormone, GH) (Montéro et al., 1998a, b) 和促性腺激素的分泌 (Wong et al., 2000), 引

2005-05-06 收稿, 2005-08-29 接受

* 国家 863 资源与环境技术领域海洋生物技术主题资助课题 (No.2001AA621110, No.2001AA621010), 国家自然科学基金农业倾斜项目 (No.39970586), 教育部科学技术研究重点资助项目 (No.02150), 广东省自然科学基金团队项目 (No.20023002) [This research was funded by the grants from National Marine 863 Project of China (No.2001AA621010, No.2001AA621110), the National Natural Science Foundation Agricultural Program of China (No.39970586), the Educational Ministry Key Project of Scientific and Technological Research (No.02150), and Guangdong Provincial Natural Science Foundation Team Program (No.20023002)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: ls32@zsu.edu.cn

© 2005 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

起了研究者的关注。

鱼类的生殖和生长之间存在着一些相互作用的神经内分泌调节作用。鱼类养殖生产中，一个养殖品种要能够发挥生殖和生长优势，才是真正的优良品种，增强生长的优势而影响生殖的优势或相反，都是不可取的。因此，对鱼类生殖和生长的内分泌调控做深入研究，阐明其促进或抑制性作用机理，特别是发掘对生殖和生长都起促进作用的神经内分泌因子，必将为选择和培育生长快、生育力强的品种以及能同时促进生殖和生长的高新技术开辟途径，对促进鱼类养殖生产起重大作用。

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 是我国名贵海水养殖鱼类，因存在生长较慢、性成熟较迟、生育能力低等问题，限制了斜带石斑鱼产业化发展 (林浩然, 2003)。本文研究其 PACAP 的体外表达，在得到重组产品的基础上，初步研究重组 PACAP 对 GH 分泌的影响，为鱼类找到一种既能促进生长又能提高生殖能力的新型调节剂，对促进重要海水养殖鱼类的生长与繁殖，解决斜带石斑鱼生产中的问题可能有指导作用。以往 PACAP 的获得除直接从生物体提取外，主要通过化学合成的方法生产 (Gourlet et al., 1998)，导致生产成本高。Okazaki et al. (1992) 在仓鼠细胞中表达了 PACAP 前体蛋白，陈哲宇等 (2001) 采用体外合成 PACAP 基因序列的方法，将它在大肠杆菌 pGEX 系列融合表达载体中进行表达。本实验利用 RT-PCR 方法，扩增出了 PACAP 多肽基因，采用天然序列 TRX 作为融合伴侣来进行 PACAP 的原核表达，构建了 BL21 (DE3) -pTRX-PACAP 工程菌株，重组 PACAP 能通过发酵工艺大规模生产，比之合成方法，降低了成本。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌表达宿主菌 BL21 (DE3) 和 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存；原核融合表达载体质粒 pTRX 由中山大学生命科学学院徐安龙教授惠赠；质粒载体 T-easy vector 购自 Promega 公司；斜带石斑鱼采自广东省大亚湾水产养殖基地。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、核酸分子量标准均购自 TaKaRa 公司；PACAP-38 (Human, mouse, ovine, porcine, rat) 标准为 BACHEM 公司产品；NBT/BCIP 染色试剂盒购自华美生物工程公司；寡聚核苷酸引物由上

海生工 (Sangon) 生物工程公司合成；质粒和胶回收试剂盒为 OmegaBio-tek 公司产品；纯化系统购自 CLONTECH 公司；重组鲑生长激素 (BrGH)、羊抗兔血清 (GAR) 由香港大学 Anderson 博士惠赠；兔抗鲷鱼 (*Acanthopagrus butcheri*) 生长激素多克隆抗血清为 GroPep 公司产品；兔抗绵羊 PACAP 购自 PENINSULA LABORATORIES INC. DIVISION OF BACHEM 公司；碱性磷酸酶偶联的驴抗兔 IgG 是 Promega 公司产品；Iodogen 为 Amersham 公司产品；其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据编码斜带石斑鱼腺苷酸环化酶激活多肽的 cDNA 序列 (AY869693)，设计扩增编码斜带石斑鱼 PACAP 成熟肽部分的引物对，在上游引物 5' 端加入最适保护碱基、限制性酶切位点和蛋白酶 PreScission Protease 识别位点，在下游引物中加入保护碱基、限制性酶切位点以及终止密码子，使 T_m 高于 55 $^{\circ}\text{C}$ 。

上游引物：P1: 5' cgggggtaccgatgacgatgacaagcatcagatgggatc 3'

下游引物：P2: 5' ttgcccgcctatcattgttctctaa-ctctctg 3'

1.2.2 PCR 反应 以反转录产物为模板，按常规的 PCR 反应条件进行扩增。将 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体上、克隆、测序，序列测定由上海基康公司完成。

1.2.3 克隆至原核表达载体 以 1.2.2 中质粒为模板，P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物。原核表达载体 pTRX 与经纯化的 PACAP38 片段分别用 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切，酶切产物用 T₄ DNA 连接酶连接，得到重组表达质粒 pTRX-PACAP，连接产物转化 DH5 α 菌株。进行酶切反应、DNA 片段回收、连接反应、细菌转化、质粒提取、重组子鉴定，序列测定由上海申友公司完成。将重组表达质粒转化入原核表达宿主菌 BL21 (DE3)，构建重组 BL21 (DE3) -pTRX-PACAP 工程菌株。

1.2.4 诱导表达 用含 Amp⁺ 的 LB 加富培养基，诱导采用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 和 0.2% 的葡萄糖，25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 h，阴性对照不加 IPTG。SDS-PAGE 检测重组蛋白质的表达情况。免疫印迹反应对重组质粒免疫活性进行检测。

1.2.5 融合表达蛋白的分离纯化 用 Tris 缓冲液

(pH 7.0) 洗涤诱导表达后的培养菌体, 重悬后, 冰浴下超声破碎, 电泳检测结果。收集包涵体沉淀, 将沉淀进行洗涤、变性、复性, 方法参照 Sambrook and Russell (2001)。将上清和复性后的沉淀用 TALON™ Metal Affinity Resin 纯化系统纯化。收集蛋白质洗脱峰, SDS-PAGE 检测重组蛋白质在各洗脱峰的分布情况。BCA 法测定蛋白质浓度。

1.2.6 重组 BL21 (DE3) -pTRX-PACAP 生理活性研究 斜带石斑鱼断头处死, 取脑垂体和下丘脑 (HPF), 置于盛有 M199 培养液的培养皿中, 冰上操作, 用培养液洗 3 次, 将垂体和下丘脑切成小于 1 mm^3 的碎片, 用培养液清洗 3 次, 然后将 HPF 均匀放在 24 孔培养板中, 每个孔约为 $1/3$ 个垂体的量, 加入 1 ml 培养液。置于 CO_2 培养箱培养, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度, 25°C , 预孵 16–24 h, 清洗碎片一次, 换液, 静置培养 30–60 min, 待完全贴壁, 加入不同浓度的 PACAP 标准品和重组品, 孵育 6 h 取样。利用放射免疫测定技术检测孵育液中 GH 的分泌情况, 生长激素的标记参照 Sun et al. (1997) 的方法并略做改动。

1.2.7 数据处理 每个数据表示为 3 个重复实验的平均值 \pm 标准误, 数据分析采用 SPSS 统计分析软件, 使用 Duncan 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, 当 $P < 0.01$ 时认为差异极显著。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pTRX-PACAP 的构建、表达和纯化

重组表达质粒双酶切结果如图 1。诱导后的工程菌总蛋白与诱导前的总蛋白相比, 出现了约 19 kD 的蛋白带, 与预期的相同 (图 2), 说明了外源蛋白在宿主菌中得到了有效的表达。

免疫印迹实验得到了特异性较好的阳性条带 (图 3)。包涵体复性后显示出与上清非常不同的特点, 虽然包涵体在上样缓冲液中显示出 95% 的溶解性, 但是只有 30% 的蛋白质能与 Ni^{2+} 金属螯合柱结合, 融合蛋白在 150 mmol/L 咪唑浓度被洗脱。

初步纯化的重组 PACAP 经紫外分光光度计测定 OD_{280} 和 OD_{260} , 可得透析后的 PACAP 浓度为 2.9 mg/ml, 超声上清液中重组 PACAP 的含量为 2 mg/ml。BCA 法测定, 融和蛋白在沉淀和上清中的得率分别为 90 mg/L 菌液, 纯度为 95% 以上和 65

mg/L。以上清中的含量比总菌中的融合蛋白量, 得出其最小溶解率为 10%, 最大溶解率为 40%。

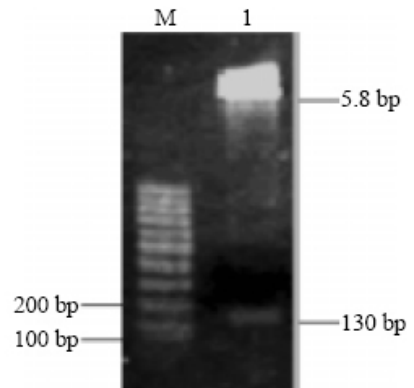


图 1 重组表达质粒双酶切结果

1: 在 130 bp 左右有一酶切后条带, 表明有外源片段的插入。M: 分子量标准。

Fig.1 The restriction analysis of recombinant plasmids

Lane 1: pTRX-PACAP digested by *Kpn* I and *Not* I. M: 100 bp DNA ladder.

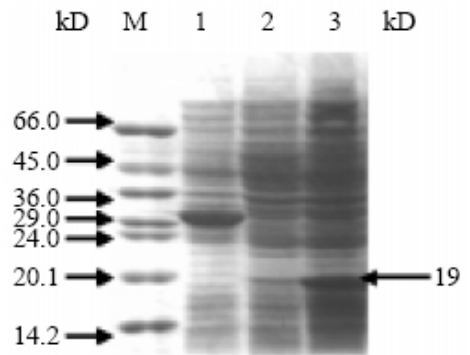


图 2 在大肠杆菌 BL21 中表达分析

1: IPTG 诱导空载体 pTRX 的表达。2: 未经 IPTG 诱导的质粒在宿主菌中总蛋白的表达。3: 经 IPTG 诱导的表达质粒重组蛋白的表达。M: 蛋白质分子量标准。

Fig.2 pTRX-PACAP expression in BL21

Lane 1: pTRX induction by IPTG. Lane 2: Total total proteins of the bacteria with pTRX -PACAP before induced by IPTG. Lane 3: Total total proteins of the bacteria with pTRX -PACAP after induced by IPTG. M: Protein molecular weight markers.

2.2 重组蛋白的生理活性研究

采用本实验室建立的 GH 放射免疫测定技术, 检测结果表明, 不同剂量 PACAP 和 pTRX-PACAP 融合蛋白 (1、10、100 和 1 000 nmol/L) 处理斜带石斑鱼 HPF 6 h 后, 两者都对 HPF 基础 GH 分泌有促进作用, 且 GH 浓度呈显著剂量依存关系上升。其中对照组 PACAP 为 10 nmol/L 的作用差异

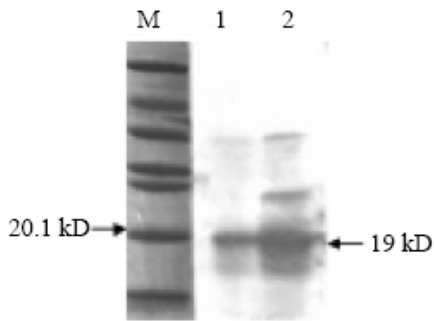


图 3 pTRX-PACAP 融合蛋白的免疫印迹反应

1: 未经诱导的菌株总蛋白的表达。2: 经过诱导的菌株总蛋白的表达。M: 蛋白质分子量标准。

Fig.3 Western blot of pTRX-PACAP

Lane 1: Bacteria Bacterial total proteins without induction. Lane 2: Bacterial total proteins after induction. M: Protein molecular weight marker

显著 ($P < 0.05$, $F = 278.27$, $n = 3$), 100 nmol/L、1 000 nmol/L 的作用差异极显著 ($P < 0.01$), pTRX-PACAP 融合蛋白浓度为 100 nmol/L、1 000 nmol/L 时的作用差异显著 ($P < 0.05$, $F = 133.88$, $n = 3$), 如图 4 所示。

3 讨 论

斜带石斑鱼 PACAP 在大肠杆菌中的重组表达是采用以硫氧还蛋白 (TRX) 为融合伴侣的胞内融合的形式, TRX 的 C-末端具有 GlySer 柔链区、6×HIS 标签和 PreScission Protease 切割位点, 其预测分子量约为 14.6 kD, 而预测的斜带石斑鱼 PACAP 分子量约为 4 kD, 所以融合蛋白 pTRX-PACAP 分子量约为 18.6 kD。免疫印迹实验中未经诱导的质粒也有微量的本底表达, 可能由于 BL21 菌株中的噬菌体 T7 RNA 聚合酶存在低水平的表达, 启动了目的基因的表达所致。

低温时表达速度较慢, 利于融合蛋白充分折叠, 有助于提高重组融合蛋白可溶性及活性。诱导的 OD₆₀₀ 值选用 0.2–0.6, 此时菌液处于对数增长期, 加入诱导剂后, 菌液浓度继续增加, 表达量增多, 避免了菌体死亡后产生的物质影响其生长。

包涵体透析复性的蛋白浓度小于 0.2 mg/ml 为佳, 可避免在此过程中形成明显沉淀, 降低复性效果。复性液中加入谷胱甘肽, 可增加重组蛋白得率。大部分的融合蛋白没有纯化出来, 可能由于部分溶解的融合蛋白处于一种结构不稳定状态, 没有被充分折叠, 导致挂柱能力较差, 要解决在包涵体纯化中碰到的种种问题, 需要对包涵体复性条件

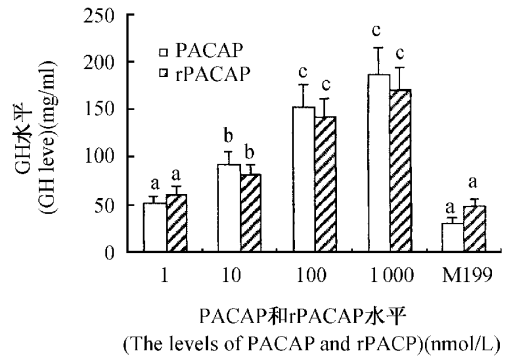


图 4 pTRX-PACAP 融合蛋白刺激离体孵育的斜带石斑鱼 HPF GH 分泌的剂量依存关系

各值为平均值 ± 标准误, 图中标有相同字母的表示相互间无显著差异 ($P > 0.05$), 不同字母代表有显著差异, Duncan's 新复极差检验。

Fig.4 Dose-response curves for increasing doses of pTRX-PACAP showing the stimulation of GH secretion from hypothalamus and pituitary fragments

Each value is the mean ± SE. Values in the same group with same superscript are no significantly different ($P > 0.05$); values in the same group with different superscript are significantly different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), Duncan's multiple range test.

进行完善。

不同剂量的重组 PACAP 对斜带石斑鱼 HPF 碎片的作用结果显示, 重组与对照品 PACAP 以剂量依存方式促进基础 GH 释放 (图 4)。表明原核表达的重组 PACAP 蛋白具有生物活性。斜带石斑鱼脑垂体对 PACAP 的应答与鲑鱼 (Parker et al., 1997)、欧洲鳗鲡 (Montéro et al., 1998a, b) 金鱼 (Leung et al., 1997) 等的一致。

目前我们正在大量收获斜带石斑鱼重组 PACAP, 并提高纯化手段, 以得到生物活性更高的产品, 用于研究其促进鱼类 GH 释放的作用机理。通过对斜带石斑鱼 PACAP 的研究, 为进一步从理论上阐明能同时促进鱼类生殖 (通过促进性腺激素的释放) 和生长 (通过生长激素的释放) 的神经内分泌因子的作用机理及理论意义, 研制促进养殖鱼类生殖和生长的相关产品打下基础。

参考文献 (References)

- Alexandre D, Anouar Y, Jégou S, Vaudry H, 2000. Structure and distribution of the mRNAs encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in the frog *Rana ridibunda*. *J. Comp. Neurol.* 421 (2): 234–246.
- Cai Y, Xin X, Shim GJ, Mokuno Y, Uehara H, Yamada T, Agui T, Matsumoto K, 1997. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP)

- stimulate interleukin-6 production through the third subtype of PACAP/VIP receptor in rat bone marrow-derived stromal cells. *Endocrinology* 138 (6): 2 515–2 520.
- Campbell RM, Scanes CG, 1992. Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul.* 2 (4): 175–191.
- Chen ZY, Chai YF, He C, Lu CL, Wu XF, 2001. Gene cloning and expression of PACAP and study of its biological activity. *Prog. Biochem. Biophys.* 28 (2): 192–196 (In Chinese).
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR, 1993. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissue. *J. Endocrinol.* 136: 159–166.
- Gourlet P, Rathé J, De Neef P, Cnudde J, Vandermeers-Piret MC, Waelbroeck M, Robberecht P, 1998. Interaction of lipophilic VIP derivatives with recombinant VIP1/PACAP and VIP2/PACAP receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 354: 105–111.
- Leung MY, Chang JP, Chow BKC, Wong AOL, 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) functions as a novel growth hormone (GH)-releasing factor in the goldfish. *Advances in Comparative Endocrinology. Proceedings of the XIIIth International Congress of Comparative Endocrinology.* Monduzzi Editore, 681–686.
- Lin HR, 2003. The sustainable exploitation of marine fish resources and the research directions of science and technology for marine fish. *Engineering Science* 3: 27–349 (In Chinese).
- McRory JE, Parker RL, Sherwood NM, 1997. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA and Cell Biol.* 16: 95–102.
- McRory JE, Sherwood NM, 1997. Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology* 138: 2 380–2 390.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH, 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567–574.
- Montéro M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, Vaudry H, 1998a. Distribution, characterization and GH-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the european eel, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology* 139: 4 300–4 310.
- Montéro M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, Vaudry H, 1998b. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the central nervous system of the European eel *Anguilla anguilla*: stimulatory effect of PACAP on GH secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865: 475–477.
- Okazaki K, Kimura C, Kosaka T, Watanabe T, Ohkubo S, Ogi K, Kitada C, Onda H, Fujino M, 1992. Expression of human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Lett.* 298: 49–56.
- Parker DB, Power ME, Swanson P, Rivier J, Sherwood NM, 1997. Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology* 138: 414–423.
- Pohl M, Wank SA, 1998. Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *J. Biol. Chem.* 273 (16): 9 778–9 784.
- Sambrook J, Russell DW, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 463–471.
- Sun X, Zhu SQ, Chan-Simon SH, Toresson G, Cheng-Christopher HK, 1997. Identification and characterization of growth hormone receptor in snakehead fish (*Ophiocephalus argus* Cantor) liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108: 374–385.
- Wong AOL, Li WS, Lee EKY, Leung MY, Tse LY, Chow BKC, Lin HR, John P, Chang JP, 2000. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell Biol.* 78: 329–343.
- 陈哲宇, 柴延丰, 何成, 路长林, 吴祥甫, 2001. 垂体腺苷酸环化酶激活多肽基因的合成表达与活性研究. *生物化学与生物物理进展* 28 (2): 192–196.
- 林浩然, 2003. 海洋鱼类资源的可持续利用和海洋鱼类科学技术的研究方向. *中国工程科学* 3: 27–34.