

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) *cyp19a1a* 原核表达与蛋白纯化*

王 金^{1,2} 文春根¹ 赵 燕² 王 慧² 王艺雅² 季相山²

(1. 南昌大学生命科学学院 南昌 330031; 2. 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘要 为表达和纯化尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)*cyp19a1a* 蛋白,本研究从尼罗罗非鱼卵巢提取总 RNA,反转录获得 cDNA 模板后,利用设计的引物 PCR 扩增 *cyp19a1a* ORF 区 1200 bp 片段,双酶切后连接到 pET-28a(+)表达载体上,经酶切验证和 DNA 测序鉴定,证明成功构建了 pET-28a-*cyp19a1a* 原核表达载体。将表达载体转化到大肠杆菌(*E.coli*) BL21 中,优化 IPTG 诱导浓度和诱导时间。结果显示,在 0.5 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后,*cyp19a1a* 重组蛋白大量表达,并以包涵体形式存在。通过 Ni²⁺-NTA 层析柱和切胶纯化,获得与预期片段大小一致的表达蛋白,并用 Western blotting 验证了纯化的蛋白为目的蛋白。本研究为制备 *cyp19a1a* 抗体和研究高温对 *cyp19a1a* 蛋白表达的影响提供了重要的基础。

关键词 尼罗罗非鱼; *cyp19a1a*; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0045-06

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)作为一种低等的脊椎动物,其性别分化和性腺发育除受基因决定外,还受外部环境因素的影响。在诸多环境因素中,温度是最重要的因子。有研究发现,高温可以诱导遗传型雌性尼罗罗非鱼发育为雄鱼。南平等(2005)在研究温度对泥鳅性腺分化的影响时,发现温度处理能同时影响芳香化酶基因的表达。在鱼类中,芳香化酶基因分为性腺型芳香化酶基因(*cyp19a1a*)和脑型芳香化酶基因(*cyp19a1b*)两种,它们分别编码性腺型芳香化酶(P450aromA)和脑型芳香化酶(P450aromB)(Tchoudakova *et al*, 1998; Tong *et al*, 2001)。*cyp19a1a* 编码的性腺型芳香化酶是细胞色素 P450 芳香化酶(P450arom)中的一种,主要在性腺中表达。已有研究发现,尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因在卵巢中的表达比在精巢中的表达强很多,高温诱导雌核发育群体性反转为雄性尼罗罗非鱼的过程中,该基因的表达变弱(Sudhakumari *et al*,

2005)。在其他鱼类,例如:青鳉(*Oryzias latipes*) (Zhou *et al*, 2007)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Blazquez *et al*, 2008)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) (Huang *et al*, 2009)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (文爱韵等, 2010)和大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*) (Matsuoka *et al*, 2006)等的 *cyp19a1a* 基因的表达情况也是类似的,这都说明了 *cyp19a1a* 在研究鱼类基因-温度性别决定调控中的重要作用。

尼罗罗非鱼繁殖周期短、繁殖力强,已成为联合国推荐养殖的优质水产品种之一。但是,由于雄鱼比雌鱼生长快,在养殖生产中,雌雄鱼混养易造成养成鱼规格不整齐。如果在相同条件下养殖全雄尼罗罗非鱼,可以大大提高单位面积产量。探讨尼罗罗非鱼性别分化机制,可为控制罗非鱼性别、培育全雄尼罗罗非鱼和提高商品鱼质量提供理论基础。因此,本研究在克隆得到尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因基础上,进行

* 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2013NY002)和山东省现代农业产业技术体系共同资助。王 金, E-mail: wangjin9159@126.com

通讯作者: 季相山, 副教授, E-mail: xsji@sdau.edu.cn

收稿日期: 2013-11-10, 收修改稿日期: 2014-01-03

尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因的原核表达和蛋白纯化, 可为制备尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 抗体和研究高温诱导对 *cyp19a1a* 蛋白表达的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

T4 DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶(Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)购自 Thermo Scientific 公司。大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)、总 RNA 提取试剂盒(TRNzol Reagent TRNzol)、BCA 蛋白质定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。DNA Marker (DL2000、DL15000)、限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind* III)、反转录试剂盒(PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser)购自 TaKaRa 公司。质粒小提试剂盒(E.Z.N.A. Endo-free Plasmid Mini Kit I)、胶回收试剂盒(E.Z.N.A. Gel Extraction Kit)均购自 Omega 公司。PageRuler[™] Prestained Protein Ladder 购自 Fermentas 公司。SDS-PAGE 凝胶试剂盒、考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液购自 Solarbio 公司。Ni²⁺-NTA 柱购自南京金丝瑞生物科技有限公司。小鼠抗 His-Tag 的一抗、羊抗鼠 IgG-HRP 二抗购自杭州华安生物科技有限公司。ECL 发光试剂盒(BeyoECL Plus) 购自碧云天生物技术研究。其他试剂均为分析纯。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

2012 年 10 月, 购自山东省淡水水产研究所的 4 月龄的尼罗罗非鱼暂养于实验室鱼缸内用于 RNA 提取。按照 TRNzol Reagent TRNzol 总 RNA 提取试剂说明书提取尼罗罗非鱼卵巢组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的提取效果, 紫外分光光度计(Eppendorf)测定其含量和纯度。

cDNA 第一链的合成 按照 TaKaRa RNA PCR Kit 方法合成 cDNA 第一链。第一步, 基因组 DNA 的除去反应: gDNA Eraser 1 μ l、5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ l、Total RNA 1 μ l、加 ddH₂O 至 10 μ l。在 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 2 min, 4 $^{\circ}$ C Hold。第二步, 反转录反应: 5 \times Prime-Script[®] Buffer II 4 μ l、PrimeScript[®] RT Enzyme Mix* \times 4 1 μ l、第一步反应液 10 μ l、加 ddH₂O 至 20 μ l。在 PCR 仪中进行如下反应: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。

1.3 抗原性分析、引物设计与 *cyp19a1a* 基因的克隆

应用 DNASTAR 软件分析尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因的抗原性, 选择抗原性较强的氨基酸序列作为目的片段。从 NCBI 中查找尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* (GenBank:

AF472620.1) 序列, 并根据载体 pET-28a(+) 序列设计引物, 上游引物含有 *Bam*H I 酶切位点(GGATCC), 下游引物含有 *Hind* III 酶切位点(AAGCTT), 每个酶切位点前都加有对应的保护性碱基。引物序列:

cyp19a1a-F:

5'-ACGCGGATCCGTGCCAGGTCCTTCTTCTGTTG-3'

cyp19a1a-R:

5'-ATCCCAAGCTTATCACAAAATGGATTTCATCATCAC-3'

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: Phusion DNA Polymerase 0.5 μ l, 5 \times Phusion HF Buffer 10 μ l, dNTP Mixture 4 μ l, cDNA 2 μ l, 引物各 2.5 μ l, H₂O 28.5 μ l。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Omega 公司的胶回收试剂盒进行目的片段的回收。

1.4 原核表达质粒的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别双酶切 *cyp19a1a* 基因 cDNA 片段和 pET-28a(+) 表达载体质粒, 切胶回收纯化后, 将酶切后的片段和载体相连接, 构建重组表达载体 pET-28a-*cyp19a1a*, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆摇床培养过夜, 并进行菌液 PCR 检测, 同时提质粒送上海英潍捷基有限公司测序。

1.5 不同诱导时间对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响

将测序正确的重组表达载体 pET-28a-*cyp19a1a* 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞。挑取含有重组质粒的单菌落于 5 ml LB 液体培养基(含 kana 50 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。将阳性重组菌按 1:100 的比例接种于含 50 μ g/ml kana 的 50 ml LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600 nm} 为 0.4-0.6 时, 取 300 μ l 菌液作未诱导对照, 其他加异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D- thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 于 37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养, 分别诱导 2、4、6、8 和 10 h 后各取 300 μ l 菌液, 用 PBS 洗菌液两次后, 加 30 μ l PBS 混匀, 加 10 μ l 4 \times loading buffer, 3-5 min 沸水浴, -20 $^{\circ}$ C 冻存 5 min 以上, 采用 SDS-PAGE (浓缩胶浓度 50 mg/ml, 分离胶浓度 12 mg/ml), 考马斯亮蓝 G-250 染色检测蛋白表达情况, 分析目的蛋白表达情况。

1.6 不同浓度 IPTG 对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响

按 1.5 所述培养细菌, 取 300 μ l 菌液作未诱导对

照, 分别加入不同体积的 IPTG, 使其终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.0 mmol/L, 于 37℃ 继续剧烈振荡 4 h 后各取 300 μ l 菌液, 采用 SDS-PAGE(浓缩胶浓度 50 mg/ml, 分离胶浓度 12 mg/ml)、考马斯亮蓝 G-250 染色分析目的蛋白的表达情况。

1.7 蛋白表达形式的鉴定

将诱导表达的菌液离心(12000 g, 4℃), 收集菌体, 加 1×PBS 重悬, 超声破碎, 离心(12000 g, 4℃), 收集上清液与沉淀, 分别与 4×loading buffer 预混, 3–5 min 沸水浴, -20℃ 冻存 5 min 以上, 以 SDS-PAGE(浓缩胶浓度 50 mg/ml, 分离胶浓度 12 mg/ml)、考马斯亮蓝 G-250 染色分析目的蛋白的表达情况。

1.8 目的蛋白纯化与 Western blotting 鉴定

诱导后收集菌体, 进行超声波破碎, 离心后的沉淀用包涵体洗涤缓冲液重悬, 离心后上清液进行 His-tagged 镍柱亲和层析柱亲和纯化, 纯化结果用 SDS-PAGE 检测。将经 Ni²⁺-NTA 柱纯化过的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 用 KCl 染色法回收 *cyp19a1a* 蛋白, 使纯度达到接近 100%。根据 BCA 蛋白质定量试剂盒(天根)操作说明, 测定纯化后样品的蛋白浓度。

KCl 纯化的重组表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 在 4℃ 条件下经 108 mA 恒流转膜 1.5 h 至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入鼠抗 His-Tag 一抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 羊抗鼠 IgG-HRP 二抗室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; ECL 显色, 暗室曝光, 观察结果。

2 结果与分析

2.1 pET-28a-*cyp19a1a* 重组载体的构建

以提取的尼罗罗非鱼卵巢的总 RNA 为模板, 以 *cyp19a1a-F* 和 *cyp19a1a-R* 为引物, 经 RT-PCR 获得 *cyp19a1a* 基因目的片段, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 在约 1221 bp 处可观察到一条清晰的 DNA 条带, 与预期的 *cyp19a1a* 基因大小一致(图 1, 泳道 1)。

cyp19a1a 基因目的片段与 pET-28a(+) 载体双酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 结果见图 1(泳道 2 和泳道 3), 分别在约 1205 bp 和 5343 bp 处可清楚地观察到一条 DNA 条带。将两者连接后获得重组载体 pET-28a-*cyp19a1a*, 重组载体 pET-28a-*cyp19a1a* 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株后, 随机挑取 4 个单克隆摇床培养过夜, 菌液 PCR 扩增经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 发现在约 1221 bp 处有一条清晰的 DNA 条带(图 1, 泳道 4–7), 说明 *cyp19a1a* 基因目的片段已成功插入 pET-28a(+) 载体中。随机挑取 4 个单克隆提取质粒送测序公司测序, 测序结果表明成功克隆到大小为 1200 bp 的 *cyp19a1a* 基因的目的片段。

2.2 融合蛋白的表达及蛋白表达形式的鉴定

转化 pET-28a(+) 的大肠杆菌 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导未出现特异性蛋白条带, 重组载体 pET-28a-*cyp19a1a* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中经 IPTG 诱导后实现了特异性融合蛋白表达(图 2), 对收集的菌体超声破碎, 离心后得到的上清液和重悬沉淀分别进行电

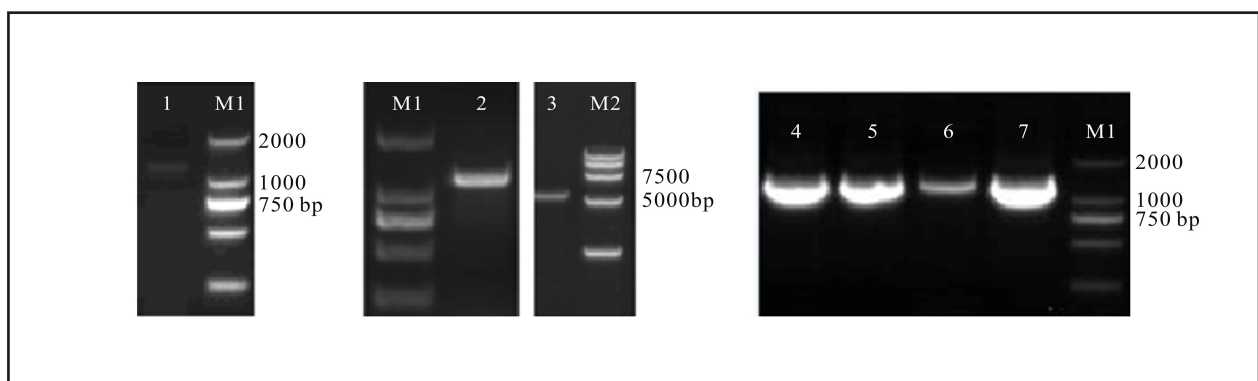


图 1 *cyp19a1a* 基因扩增及 pET-28a-*cyp19a1a* 重组载体构建

Fig.1 Amplification of *cyp19a1a* gene and construction of pET-28a-*cyp19a1a* recombinant vector

M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL15000 DNA Marker; 1: *cyp19a1a* 基因 PCR 产物; 2: *cyp19a1a* 基因双酶切后琼脂糖凝胶回收产物; 3: pET-28a(+) 载体线性化后琼脂糖凝胶回收产物; 4–7: 菌液 PCR 鉴定

M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL15000 DNA Marker; Lane 1: *cyp19a1a* gene PCR amplification products; Lane 2: double digestion product of *cyp19a1a* gene recovered by agarose gel; Lane 3: product of linearized pET-28a(+) vector recovered by agarose gel; Lane 4–7: PCR identification of bacteria

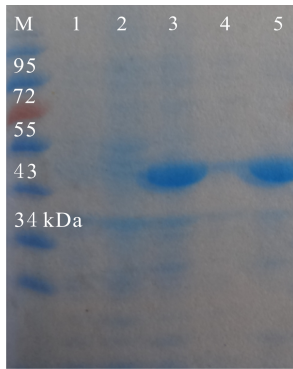


图 2 融合蛋白的表达及蛋白表达形式的鉴定

Fig.2 Expression of fusion protein and identification of the protein expression pattern

M: 预染蛋白标记; 1. 空载体 pET-28a(+)在 BL21(DE3)中的诱导表达 2. 未诱导的 pET-28a-cyp19a1a 融合蛋白 3. 转化 pET-28a-cyp19a1a 在 BL21(DE3)的诱导表达; 4. 上清液中融合蛋白的表达; 5. 沉淀中融合蛋白的表达

M: Pre-stained Protein Ladder; Lane 1: Empty vector pET-28a(+) induced with IPTG in *E. coli* BL21(DE3); Lane 2: pET-28a-cyp19a1a vector in *E. coli* BL21 (DE3) without IPTG; Lane 3: pET-28a-cyp19a1a vector induced with IPTG in *E. coli* BL21 (DE3); Lane 4: Fusion protein supernatant; Lane 5: Fusion protein precipitate

高无明显变化(图 3B)。高浓度的 IPTG 不利于细胞的生长,因此,选择 0.5 mmol/L 的 IPTG 作为最佳诱导浓度。

2.4 蛋白纯化及鉴定

将经 His-tagged 镍柱亲和层析柱纯化的蛋白流出液依次分管盛装,经 SDS-PAGE 电泳检测后发现,除目的蛋白外,仍有一些杂蛋白(图 4A),这可能是由于杂蛋白的非特异性结合。经过 KCl 染色法回收的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测,可见纯度为接近 100% 的 cyp19a1a 蛋白单一条带(图 4B),KCl 纯化后蛋白的浓度为 0.82 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

经 Western blotting 检测发现,所纯化的蛋白可以被 His 抗体特异性识别,并在 48 kDa 处有特异性条带(图 4C),说明纯化得到的蛋白是目的蛋白。

3 讨论

本研究应用 DNASTAR 软件分析 *cyp19a1a* 基因的

泳,可见经诱导后融合蛋白在上清液中的表达量很低(图 2,泳道 4),而在细胞破碎收集的沉淀中大量表达(图 2,泳道 5),因此确定 cyp19a1a 蛋白主要以包涵体的形式存在。

2.3 不同诱导时间和诱导剂浓度对目的蛋白在大肠杆菌中表达的影响

含重组载体 pET-28a-cyp19a1a 的 BL21(DE3) 细胞经诱导表达后,在大约 48 kDa 处有一条清晰的条带,2、4、6、8 h 依次变大,10 h 时的表达量下降,所以确定 8 h 为最佳诱导时间(图 3A)。诱导剂 IPTG 浓度在 0.1–1.0 mmol/L 范围内,表达量随浓度的升

抗原性,选择抗原性较强的 61–460 氨基酸作为目的片段,采用 RT-PCR 的方法对尼罗罗非鱼 *cyp19a1a*

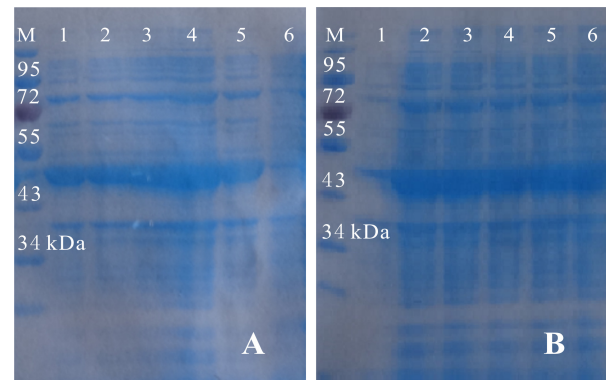


图 3 不同诱导时间(A)和诱导剂浓度(B)对 cyp19a1a 蛋白在大肠杆菌中表达的影响

Fig.3 Influence of different induction time (A) and different concentration of inducer (B) on the expression of cyp19a1a protein in *E. coli*

M: 预染蛋白标记; A1-5: 转化 pET-28a-cyp19a1a 质粒的 BL21(DE3)工程菌分别诱导 2、4、6、8 和 10 h 后菌体蛋白; A6, B1: 未诱导的 *E. coli* BL21; B2-6: 终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导后菌体蛋白

M: Pre-stained Protein Ladder; Lane A1-5: Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformed by pET-28a-cyp19a1a for 2, 4, 6, 8 and 10 h respectively; Lane A6, B1: Uninduced *E. coli* BL21; Lane B2-6: Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformed by pET-28a-cyp19a1a induced with IPTG 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 mmol/L respectively

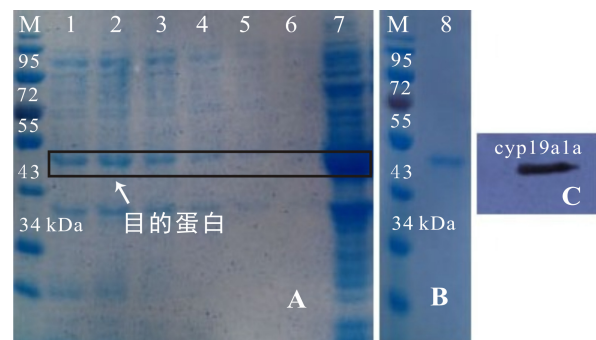


图 4 蛋白纯化及 Western blotting 鉴定

Fig.4 Results of protein purification and identification by Western blotting

M: 预染蛋白标记; 泳道 1-6: 转化 pET-28a-cyp19a1a 质粒的 *E. coli* BL21 纯化产物; 泳道 7: pET-28a-cyp19a1a 质粒的 *E. coli* BL21 全蛋白; 泳道 8: 聚丙烯酰胺; C: 目的蛋白 Western blotting 检测

M: Prestained Protein Ladder; Lane 1-6: Purification products from *E. coli* BL21 transformed by pET-28a-cyp19a1a plasmid; Lane 7: pET-28a-cyp19a1a whole protein in *E. coli* BL21; Lane 8: polyacrylamide; C: identification of cyp19a1a by Western blotting

基因 ORF 区部分片段进行克隆, 获得 1200 bp 的片段。目前已从十几种鱼中克隆出 *cyp19a1a* 基因, 它们包括青鳉(*Oryzias latipes*)(Tanaka *et al.*, 1995)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Kazeto *et al.*, 2001)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)(Galay-Burgos *et al.*, 2006)、鳗鲡(*Anguilla anguilla*)(Tzchori *et al.*, 2004)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Yoshiura *et al.*, 2003)等。近年来, 对 *cyp19a1a* 编码的芳香化酶的基因结构、功能进行了较多研究, 但是对鱼体内芳香化酶活性的研究主要集中在脑、脑垂体和脊髓, 在性腺和其他组织中芳香化酶活性的研究报道比较少。

本研究将 *cyp19a1a* 基因目的片段及 pET-28a(+) 载体双酶切片段连接后, 成功构建了 pET-28a-*cyp19a1a* 原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导后高效表达相对分子质量约为 48 kDa 的融合蛋白, 经过 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化、KCl 染色、SDS-PAGE 胶回收, 获得接近 100%纯度的融合蛋白。韩俊英等(2011)优化了脊尾白虾 *hsp90* 基因原核表达条件, 发现诱导时间和 IPTG 浓度均对重组蛋白有较大影响, 这与本研究结果一致。吴任等(2006)和韩俊英等(2011)研究发现, 诱导剂 IPTG 浓度在 0.1–1.0 mmol/L 的范围内均适于重组蛋白的诱导表达。本研究中随着 IPTG 浓度的增加, 目的蛋白并没有显著变化, 但是高浓度 IPTG 对大肠杆菌 BL21 生长有不利影响, 因此, 本研究选用 0.5 mmol/L 的 IPTG 浓度。此外, 吴任等(2006)报道诱导 5 h 可获得最大含量的目的蛋白, 而陈大玮等(2011)报道诱导 4 h 可获得大量表达。但是在本研究中, 在诱导 8 h 时获得最大含量的 *cyp19a1a* 蛋白, 而后随着时间的推移其表达量下降。推测造成这种差异的原因, 可能是与细菌达到死亡期后菌体发生自溶, 释放的蛋白酶降解了一部分所表达的融合蛋白有关。

pET 系统标签小, 不用切割, 对蛋白活性一般没有影响, 纯化比较方便。pET-28a(+)表达载体 C 端有编码 6 个组氨酸标签的序列(6 × His-Tag), 可以用来鉴定重组蛋白, 还可以与 Ni-NTA 层析介质 Ni²⁺特异结合分离纯化表达的重组蛋白。因此本研究将克隆得到的 1200 bp *cyp19a1a* 目的片段插入到 pET-28a(+)表达载体, 构建了 pET-28a(+)-*cyp19a1a* 重组表达载体并成功表达重组蛋白。重组蛋白在大肠杆菌中有胞外分泌、胞内表达和周质空间表达三种表达形式。胞内表达的蛋白容易形成包涵体, 不利于融合蛋白的正确折叠, 且复性较难。环状或缺口的质粒 DNA, 以及

脂体、脂多糖等, 难溶于水, 易溶于尿素、盐酸胍等变性剂。pET-28a(+)-*cyp19a1a* 重组蛋白经表达特性分析显示主要以包涵体形式存在, 使用尿素裂解后成为可溶解的蛋白。经过 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化、SDS-PAGE、Western-blot 检测, 在分子量为 48 kDa 处有特异性条带, 且可被鼠抗 His-Tag 识别。

本研究通过原核表达技术大量表达出了 *cyp19a1a* 蛋白, 并利用亲和层析、KCl 染色、SDS-PAGE 胶回收法得到了纯化的 *cyp19a1a* 蛋白, 这为 *cyp19a1a* 抗体制备和利用免疫组化及免疫印迹研究高温诱导对尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 蛋白的影响奠定了基础。

参 考 文 献

- 文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲆 *dmrtl* 基因的克隆及其与 P450arom 基因的组织表达分析. 海洋科学, 2010, 34(11): 97–101
- 陈大玮, 邓利, 何凡, 等. 棕点石斑鱼 *Piscidin* 样肽基因的克隆及其成熟肽的原核表达. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 126–133
- 吴任, 谢数涛, 孙勇, 等. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达. 中国水产科学, 2006, 13(2): 305–309
- 南平, 杜启艳, 燕帅国, 等. 温度对泥鳅和大鳞副泥鳅性腺分化的影响和 CYP19a 基因的克隆与时空表达. 中国水产科学, 2005, 12(4): 407–413
- 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 44–50
- Blazquez M, Gonzalez A, Papadaki M, *et al.* Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Gen Comp Endocr, 2008, 158(1): 95–101
- Galay-Burgos M, Gealy C, Navarro-Martin L, *et al.* Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphisms. Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol, 2006, 145(1): 47–53
- Huang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper. Mol Cell Endocr, 2009, 307(1–2): 224–236
- Kazeto Y, Ijiri S, Place AR, *et al.* The 5'-flanking regions of CYP19A1A1 and CYP19A1A2 in zebrafish. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288: 503–508
- Matsuoka MP, van Nes S, Andersen Ø, *et al.* Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006, 144(1): 128–135
- Sudhakumari CC, Senthilkumaran B, Kobayashi T, *et al.*

- Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation. *Fish Physiol Biochem*, 2005, 31(2-3): 129-135
- Tanaka M, Fukada S, Matsuyama M, *et al.* Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, Medaka (*Oryzias latipes*). *J Biochem*, 1995, 117: 719-725
- Tchoudakova A, Callard GV. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozyms in brain and ovary. *Endocrinol*, 1998, 139(4): 2179-2189
- Tong SK, Chiang EF, Hsiao PH, *et al.* Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish cyp19 (P450 aromatase) genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 79(1-5): 299-303
- Tzchori I, Degani G, Hurvitz A, *et al.* Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Gen Comp Endocr*, 2004, 138(3): 271-280
- Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, *et al.* Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biol Reprod*, 2003, 68(5): 1545-1553
- Zhou LY, Wang DS, Shibata Y, *et al.* Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362: 619-625

(编辑 冯小花)

The Prokaryotic Expression and the Protein Purification of Nile Tilapia *cyp19a1a* Gene

WANG Jin^{1,2}, WEN Chungeng¹, ZHAO Yan², WANG Hui², WANG Yiya², JI Xiangshan²

(1. Institute of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract *Cyp19a1a* gene encodes aromatase, the key enzyme that converts androgens into estrogens. However little is known about the protein expression and purification of this gene. In this study, the total RNA was extracted from the ovary of Nile tilapia and was then reverse-transcribed to cDNA. The 1221 bp ORF partial region of *cyp19a1a* was amplified using RT-PCR, and the amplified fragments were purified for the following cloning. The amplified DNA fragments were ligated into pET-28a(+) expression vector for the construction of the prokaryotic expression vector pET-28a-cyp19a1a. The pET-28a-cyp19a1a vector was verified with restriction endonuclease digestion and DNA sequencing, and then transformed into *E.coli* BL21. IPTG was applied to induce the expression of pET-28a-cyp19a1a recombinant proteins. In order to optimize the protein expression we tested the inducing effects of IPTG at concentrations from 0.1 to 1.0 mmol/L. The results showed that the expression of pET-28a-cyp19a1a recombinant proteins started at 2 h after the induction with 0.5 mmol/L IPTG. The expression reached the highest level at 8 h after the induction, and began to decrease at 10 h. Nonetheless the expression levels were not significantly different at various IPTG concentrations. Therefore the optimal induction conditions were determined to be 0.5 mmol/L IPTG for 8 h. The expressed recombinant proteins were mainly found in collected cells but not in the supernatant, which indicated that these proteins formed inclusion bodies. After the purification with Ni²⁺-NTA agarose gel chromatography column we obtained the products with the expected size (48 kDa). Next the products were further purified into the specific recombinant proteins using the KCl staining method. The concentration of purified protein was 0.82 μg/μl. Western blotting results showed that the purified proteins can be detected by the His-tag antibody; hence they should be the target products. The successful expression and purification of the recombinant *cyp19a1a* protein would fundamentally improve the production of *cyp19a1a* antibody and provide insights into the effects of high-temperature on the sex differentiation in Nile tilapia.

Key words Nile tilapia; *Cyp19a1a*; Prokaryotic expression; Protein purification