

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240409002

http://www.yykxjz.cn/

陈彦, 史宝, 王成刚, 薄万军, 晏科文, 陶美君, 赵新宇, 马晓东. 星康吉鳗 *LH* 基因的克隆、序列特征分析及原核表达. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 40–52

CHEN Y, SHI B, WANG C G, BO W J, YAN K W, TAO M J, ZHAO X Y, MA X D. *LH* gene cloning, sequence feature analysis and prokaryotic expression in *Conger myriaster*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 40–52

星康吉鳗 *LH* 基因的克隆、序列特征分析及原核表达*

陈彦^{1,2} 史宝^{1①} 王成刚³ 薄万军¹
晏科文¹ 陶美君¹ 赵新宇¹ 马晓东¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;
2. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023; 3. 海阳市黄海水产有限公司 山东 烟台 265100)

摘要 促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)在鱼类配子成熟、排卵和类固醇激素合成方面发挥重要作用。通过同源克隆获得星康吉鳗(*Conger myriaster*) *LH* 基因 CDS 区序列, 利用生物信息学软件分析该基因编码蛋白的结构与特征, 并成功构建原核表达重组质粒对 *LH* 蛋白进行表达。克隆获得 *LH* 基因 CDS 区为 423 bp, 编码 140 个氨基酸。分析 *LH* 蛋白理化性质可知, 其相对分子质量为 15.56 kDa, 理论等电点为 5.85; 经亲疏水性分析发现, *LH* 蛋白为亲水性蛋白; 对信号肽和跨膜区分析结果显示, 其前 1~22 个氨基酸为信号肽, 无跨膜区; 经结构域分析, 其存在保守性较强的 GHB 结构域(由 27~132 位的 105 个氨基酸组成); 亚细胞定位分析表明, *LH* 蛋白主要定位于细胞核; 对糖基化位点及磷酸化位点分析发现, 其存在 1 个 N-糖基化位点和 3 个 O-糖基化位点, 共含有 17 个潜在的磷酸化位点; *LH* 蛋白二级结构主要含有 α -螺旋(13.6%)、 β -折叠(25%)和无规则卷曲(61.4%); 通过三级结构分析发现, 其与日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) *LH* 蛋白三级结构较为相似, 与人(*Homo sapiens*) *LH* 蛋白的三级结构存在一定差异。多序列比对及系统发育树分析结果显示, *LH* 与欧洲鳗鲡(*A. anguilla*)、花鳗鲡(*A. marmorata*)和日本鳗鲡进化关系较近, 同源性分别为 92.14%、91.43%和 90.71%。构建的重组质粒 pET-28a-*LH* 在 Rosetta (DE3)感受态细胞中成功表达, 其表达的可溶性 *LH* 重组融合蛋白条带在 SDS-PAGE 电泳检测及 Western Blot 结果中约为 26.5 kDa, 与预期表达的分子量相符。该研究为揭示星康吉鳗 *LH* 基因的分子特征及蛋白功能奠定了基础, 为后续星康吉鳗人工繁育技术的优化提供了理论参考。

关键词 星康吉鳗; 促黄体生成素基因; 基因克隆; 序列特征分析; 原核表达

中图分类号 S786; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)03-0040-13

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022023023; 2023TD51)、山东省重点研发计划(2021LZGC028)、国家重点研发计划(2023YFD2400405)和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。陈彦, Email: cycy0519@126.com

① 通信作者: 史宝, 副研究员, Email: shibao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-04-09, 收修改稿日期: 2024-05-07

鱼类的配子发生(卵子发生和精子发生)和成熟(卵母细胞成熟和精子)这2个生殖阶段由垂体和性腺产生的不同生殖激素控制,即促性腺激素(gonadotropin hormone, GtH)和类固醇激素(Ramos-Júdez *et al*, 2022)。鱼类垂体具有2种GtHs,即促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体生成素(luteinizing hormone, LH),它们进一步刺激性类固醇的合成,调控性腺的生长发育和成熟;FSH和LH在调控性腺发育成熟和配子释放中发挥不同的生理功能(Zhang *et al*, 2024)。FSH和LH是异源二聚体,具有共同的 α 亚基和不同的 β 亚基,LH β 比FSH β 更具系统保守性(Fakriadis *et al*, 2024)。在对漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)的研究中发现,卵巢中的LH β 亚基mRNA表达水平在产卵期达到峰值,说明其参与卵母细胞的最终成熟以及排卵和产卵等过程(柳学周等, 2014)。在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的卵黄形成晚期和卵母细胞成熟期间,LH β 的转录显著增加(Shi *et al*, 2015)。另外,在鲈鱼(*Scomber japonicus*)配子发生的早期对LH进行检测发现,其蛋白表达量较低甚至没有,但在性腺成熟阶段其蛋白表达量达到最高,认为其主要作用是促进类固醇激素的合成、滤泡成熟和排卵(Nyuji *et al*, 2022)。

在水产养殖业中,通常使用基于促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)和垂体提取物的外源激素调控手段来促进鱼类配子发育成熟(Ramos-Júdez *et al*, 2022)。使用重组LH可为缓解鱼类生殖障碍和发展反季节育苗提供新思路(Molés *et al*, 2020)。近年来,已有对金钱鱼(*Scatophagus argus*) (Zhang *et al*, 2018)、印度囊鳃鲶(*Heteropneustes fossilis*) (Aizen *et al*, 2023)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (高云红, 2021)、密斑刺鲃(*Diodon hystrix*) (郭煜文等, 2023)等鱼类LH克隆、重组表达的研究报道,在鳗鲡目(Anguilliformes)鱼类中已对欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*) (Degani *et al*, 2003)和日本鳗鲡(*A. japonica*) (Suzuki *et al*, 2020)的LH开展了较多研究,但对星康吉鳗(*Conger myriaster*) LH的相关研究迄今报道较少。

星康吉鳗在中国的黄海、东海、渤海以及朝鲜半岛海域和日本北部海域广泛分布。星康吉鳗具有较高的经济价值,是我国渔业重要的捕捞对象之一(杨浩等, 2020)。近几十年来,星康吉鳗的资源遭到掠夺性开发,种苗资源日益匮乏(Zhao *et al*, 2024)。目前,

星康吉鳗在我国已通过工厂化循环水养殖、工厂化开放式流水养殖、池塘养殖等人工养殖方式进行试养(赵新宇等, 2024),但其人工养殖产业发展受限,主要原因是在人工养殖条件下的星康吉鳗很难达到性成熟,无法通过人工繁育提供玻璃鳗苗种,亟需开展星康吉鳗繁育技术研究(史宝等, 2023)。本研究通过对星康吉鳗的LH基因进行克隆以及生物信息学分析,并采用原核表达方式获得了重组LH蛋白,以期为进一步研究星康吉鳗LH的繁殖调控功能奠定理论基础,为后续利用星康吉鳗重组LH蛋白诱导人工培育的亲鳗性成熟提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验所用星康吉鳗取自山东省海阳市黄海水产有限公司。从工厂化养殖条件下的星康吉鳗亲鳗后备群体中随机选择大小相近、体色正常、皮肤光滑的健康鱼,平均体长为(578.4 $\pm$ 12.5) mm,平均体质量为(330.6 $\pm$ 5.2) g。实验前置于室内循环水养殖系统的3 000 L养殖水槽中暂养驯化2周,每日早晚各投喂1次,24 h持续充氧,养殖水温为21.5~24.0 $^{\circ}\text{C}$,氨氮<0.45 mg/L,亚硝酸盐氮<0.06 mg/L, pH维持在7.8~8.2,盐度为28~32,溶解氧 $\geq$ 6.0 mg/L。采用MS-222麻醉,迅速解剖取其垂体组织保存于液氮中(-196 $^{\circ}\text{C}$),后转入-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存,用于总RNA提取。

1.2 总RNA提取和cDNA第一链的合成

使用RNAex Pro试剂(艾科瑞,中国)提取星康吉鳗垂体组织中的总RNA,通过1%琼脂糖凝胶(艾科瑞,中国)电泳与超微量紫外检测仪(NanoDrop 2000C) (Thermo, 美国)测定RNA的纯度和浓度。按照cDNA合成试剂盒(艾科瑞,中国)说明书将RNA进行反转录合成第一链cDNA,获得的cDNA模板保存至-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 LH基因cDNA克隆及分析

以星康吉鳗垂体组织cDNA为模板进行LH基因克隆。基于NCBI上已公布的星康吉鳗近缘物种的LH基因编码保守区序列,利用软件Primer Premier 5.0设计克隆引物LH-F (5'-ATGTTAAATTCAGGGCTGACCTAC-3')和LH-R (5'-CTAAGCAGGGAGACTGGCTTT-3'),并委托生工生物工程(上海)股份有限公司合

成。使用 Bio-Rad S1000 PCR 仪(伯乐, 新加坡)按照 ApexHF HS DNA 聚合酶预混液-FS(含染料)(艾科瑞, 中国)操作说明对垂体 cDNA 模板进行 PCR 扩增, 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测和分离, 用 DNA 凝胶回收试剂盒(艾科瑞, 中国)回收并纯化目的 PCR 产物, 将目的产物连接到 pEASY-T1 克隆载体(全式金, 中国), 然后转化到 Trans1-T1 感受态细胞(全式金, 中国)中, 涂布于含氨苄青霉素(天根, 中国)抗性的琼脂糖平板上, 37 °C 过夜培养, 挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。PCR 体系(25 μ L): 12.5 μ L 2 $\times$ Accurate Taq Master Mix, 0.5 μ L cDNA, 0.5 μ L 正反向引物, 11 μ L ddH₂O。PCR 条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

1.4 LH 基因生物信息学分析

使用软件 DNAMAN 6.0 将测序所得的星康吉鳗 LH 基因序列片段进行比对拼接, 获得星康吉鳗 LH 基因的完整编码区(ORF)序列并推导其氨基酸序列; 利用 NCBI 数据库对功能结构域进行预测(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); 理化性质应用 ProtParam 软件进行分析(<https://web.expasy.org/protparam/>); 亲水性与疏水性利用 ProtScale 软件进行分析(<https://web.expasy.org/protscale/>); 跨膜区利用 DeepTMHMM 在线网站进行预测(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM/>); 信号肽预测运用 SignalP 6.0 Server 软件进行分析(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>); N-糖基化位点运用 NetNGlyc1.0 进行分析(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>); O-糖基化位点运用 YinOYang1.2 进行分析(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/YinOYang-1.2/>); 磷酸化位点利用 NetPhos3.1 进行分析(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>); 通过 PSORT Prediction 进行亚细胞定位分析(<https://www.genscript.com/psort.html>); 蛋白质二级结构通过 Psipred 网站进行预测(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>); 蛋白质三级结构从 AlphaFold 蛋白结构数据库中检索(<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)。通过 NCBI 数据库中的 BLAST 进行 LH 蛋白的同源性分析, 获得其他物种的氨基酸序列。运用 MEGA 6.0 软件, 以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建不同物种 LH 系统发育进化树(自扩展值为 1 000); 星康吉鳗 LH 氨基酸序列与其他不同鱼类 LH 氨基酸序列同源性运用在线网站 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/>

clustalo)进行比对分析。

1.5 构建 LH 蛋白的重组表达载体

根据星康吉鳗 LH 基因序列, 参照 pET-28a(+)载体(天根, 中国)上的多克隆位点排列特点, 选取 *Nde* I 和 *Xho* I 作为酶切位点, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对特异性引物 LH-MF: 5'-GG[CATATG]ATGTC AATCTACCCAGAATGCAG-3' 和 LH-MR: 5'-AA [CTCGAG]C-TAAGCA-GGGAGACTGGCTTT-3'。在引物 LH-MF 和 LH-MR 的 5'端分别加入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点(方框标注)。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。将得到的目的片段连接至 pEASY-T1 克隆载体, 转化到 Trans1-T1 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素抗性的琼脂糖平板上, 37 °C 过夜培养, 挑取阳性克隆, 使用 LB 液体培养基培养。使用质粒 DNA 提取试剂盒(艾科瑞, 中国)提取重组质粒 pEASY-T1-LH, 将质粒样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

在 37 °C 条件下, 使用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I (TaKaRa, 日本)对测序成功的重组质粒 pEASY-T1-LH 与 pET-28a(+)载体进行 3 h 双酶切, 双酶切产物使用 1%琼脂糖凝胶检测。双酶切产物利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收并纯化, 用 T4 连接酶(TaKaRa, 日本)在 16 °C 条件下将双酶切产物连接 3 h, 然后转化到 BL21 感受态细胞(全式金, 中国), 之后涂布于含卡那霉素(全式金, 中国)抗性的琼脂糖平板上, 37 °C 过夜培养。挑取阳性克隆, 使用 LB 液体培养基进行培养, 利用少量菌液进行 PCR 扩增检测。后通过质粒 DNA 提取试剂盒, 提取重组质粒 pET-28a-LH, 将质粒样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

1.6 LH 重组蛋白的诱导表达、纯化及 Western Blot 验证

将测序正确的重组质粒 pET-28a-LH 转化到表达菌株 Rosetta (DE3)感受态细胞(博迈德, 中国), 涂布于含卡那霉素的琼脂糖平板上, 37 °C 过夜培养, 挑取阳性克隆使用 LB 液体培养基培养 4 h, 后将菌液转到 4 个 100 mL 含卡那霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中扩大培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8, 然后分别加入终浓度为 0.01、0.1、0.5、1 mmol/L 的 IPTG 在 16 °C 条件下诱导表达 16 h。离心收集菌体(8 000 r/min, 10 min), PBS 洗涤并重悬菌体, 每组各留存 1 mL 进行后续检测。剩余重悬液用超声波细胞粉碎机(新芝,

宁波)破碎菌体后, 12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀, 用 12% 聚丙烯酰胺凝胶(金斯瑞, 中国)电泳(SDS-PAGE)检测上清液和沉淀中的蛋白表达情况。将样品与 5×SDS 上样缓冲液按照 5:1 (体积比)混匀并于 100 °C 水浴锅中煮 10 min, 然后 12 000r/min 离心 10 min, 取 10 μL 进行 SDS-PAGE(浓缩胶 100 V, 10 min; 分离胶 140 V, 60 min), 后经考马斯亮蓝试剂(碧云天, 中国)染色, ddH₂O 浸泡脱色后经凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)观察结果。

使用 His 标签蛋白纯化试剂盒(碧云天, 中国)对目的蛋白进行亲和层析柱纯化, 通过超滤离心管(索莱宝, 中国)浓缩, 采用 SDS-PAGE 检测, 方法同上。收集纯化后的 LH 重组蛋白, 在 SDS-PAGE 电泳后利用 eBlot™ L1 蛋白快速湿转仪(金斯瑞, 中国)转移至硝酸纤维素(PVDF)膜上, 在封闭液中室温封闭 PVDF

膜 1 h; 用 TBST 洗脱 3 次, 每次 5 min; 加入 1:2 000 稀释的鼠抗 6×His 单克隆抗体(HRP conjugated)的一抗, 4 °C 过夜孵育后, 在室温下孵育 1 h; 用 TBST 洗脱 3 次, 每次 5 min; 无需孵育二抗; 用 ECL 化学发光试剂盒(索莱宝, 中国)在暗盒内显色 1~2 min, 后使用化学发光成像系统(VILBER, 法国)拍照观察。

2 结果与分析

2.1 星康吉鳗 LH 基因的序列分析

根据设计的引物对星康吉鳗 LH 基因 CDS 区进行扩增, 得到 LH 基因的 CDS 区序列长为 423 bp (GenBank 登录号: PP210936.1), 共编码 140 个氨基酸, 序列中存在 1 个 GHB 结构域(由 27~132 位的 105 个氨基酸组成)(图 1)。

```

1  ATGTC AATCTACCCAGAATGCAGTTGGCTCCTCTTTGCATGCATGTGCCATCTCCTTGTGTCTGCTGGAGGCTCT
1  M S I Y P E C S W L L F A C M C H L L V S A G G S
76 GTACTGCAGCCTTGCGAGCCAATCAATGAGACCATTCTGTGGAGAAAGATGGATGTCCAAATGTCTGGTGTTC
26  V L Q P C E P I N E T I S V E K D G C P K C L V F
151 CAGACCTCCATCTGCAGTGGCCACTGCATGACCAAGGACCAAGCTACAAGAGCCGACTGTCCACAGTGTACCAG
51  Q T S I C S G H C M T K D P S Y K S R L S T V Y Q
226 CGAGTGTGCACGTACCGGACGTCCTATGAGACAGTCCGCTGTGCCAGATTGCCGCCCGGAGTGATCCCCAT
76  R V C T Y R D V R Y E T V R L P D C R P G V D P H
301 GTGACCTTCCCCGTGGCTCTGAGCTGTGACTGTAACTGTGCACCATGGAGACCTCTGACTGCACCATCCAGAGC
101 V T F P V A L S C D C N L C T M E T S D C T I Q S
376 CTGAGGCCTGACTTCTGCATGAGCCAGAAAGCCAGTCTCCCTGCTTAG
126 L R P D F C M S Q K A S L P A *

```

图 1 星康吉鳗 LH 基因 CDS 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Coding sequence of *C. myriaster* LH gene and the deduced amino acid sequence

方框部分: 起始密码子; 双下划线: GHB 功能结构域; 终止密码子用*表示。

Start codon is marked with frame. Functional domain GHB is marked with virtual underline. The termination codon is denoted by *.

2.2 LH 蛋白生物信息学分析

2.2.1 星康吉鳗 LH 蛋白质理化性质分析 LH 编码蛋白的理化性质预测分析结果显示, 该基因编码 140 个氨基酸, 其中, 半胱氨酸(Cys)和丝氨酸(Ser)含量占比最高, 均为 15 个, 占总氨基酸量的 10.7%, 而色氨酸(Trp)占比最少, 仅为 1 个, 占 0.7%。氨基酸编码蛋白分子式为 C₆₆₉H₁₀₆₀N₁₈₀O₂₀₆S₂₀, 该蛋白含有 14 个带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)和 12 个带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)。相对分子质量(M_w)为 15.56 kDa, 脂肪族指数(aliphatic index)为 73.71, 理论等电点(pI)为 5.85, 蛋白不稳定系数(instability index)为 66.49, 表明该蛋白为不稳定性蛋白。

2.2.2 星康吉鳗 LH 蛋白亲水性与疏水性预测分析

通过 ProtScale 分析 LH 蛋白的亲水性与疏水性, 结果显示, 第 16 位氨基酸(Cys)疏水性最强, 为 2.233, 第 65 位氨基酸(Ser)亲水性最强, 为 -2.333。大部分氨基酸表现为负值, 预测 LH 蛋白可能是一种稳定的亲水性蛋白(图 2)。

2.2.3 星康吉鳗 LH 蛋白的信号肽和跨膜区预测

使用 DeepTMHMM 网站预测 LH 蛋白跨膜结构域, 结果显示, 该蛋白无跨膜区(图 3)。运用 SignalP 6.0 Server 软件预测信号肽, 结果显示, Signal Peptide (Sec/SPI)值为 0.999 2, Other 值为 0.000 2, 表明 LH 蛋白的前 1~22 个氨基酸为信号肽。

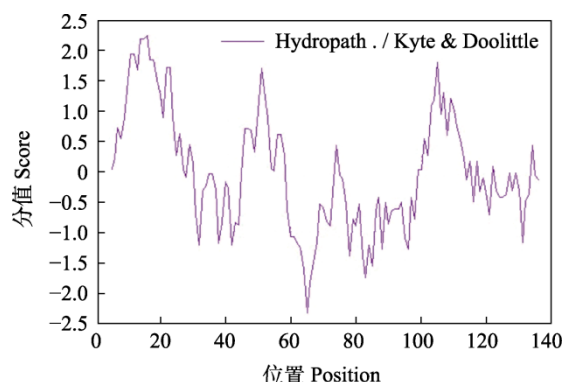


图2 LH蛋白亲/疏水性预测

Fig.2 Prediction of hydrophilicity and hydrophobicity of LH

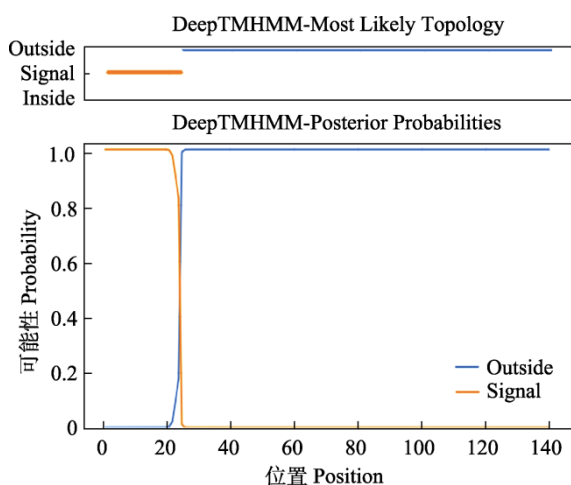


图3 LH蛋白跨膜结构域预测

Fig.3 Prediction of transmembrane domain of LH protein

2.2.4 星康吉鳗 LH 蛋白的糖基化位点及磷酸化位点预测 对 LH 蛋白的 N-糖基化位点和 O-糖基化位点的预测发现, 该蛋白存在 1 个 N-糖基化位点(图 4)和 3 个 O-糖基化位点(图 5)。NetPhos3.1 网站分析结果显示, LH 蛋白共有 17 个可能的磷酸化位点, 其中, Ser、Thr 及 Tyr 磷酸化位点分别有 9 个、6 个和 2 个(图 6)。

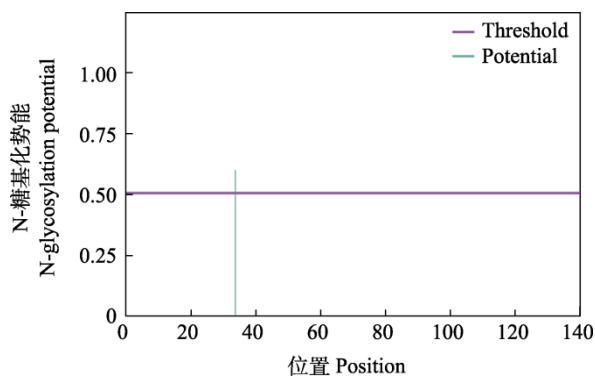


图4 LH蛋白的 N-糖基化位点预测

Fig.4 Prediction of N-glycosylation site of LH protein

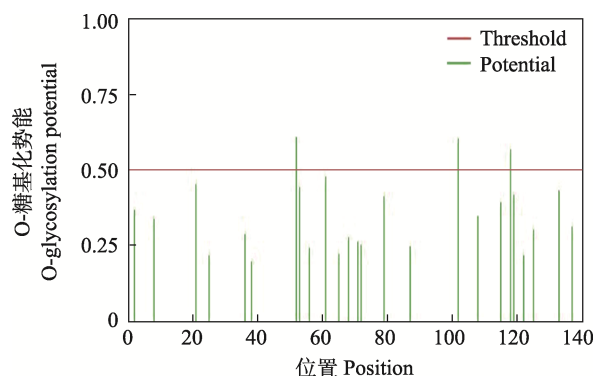


图5 LH蛋白的 O-糖基化位点预测

Fig.5 Prediction of O-glycosylation site of LH protein

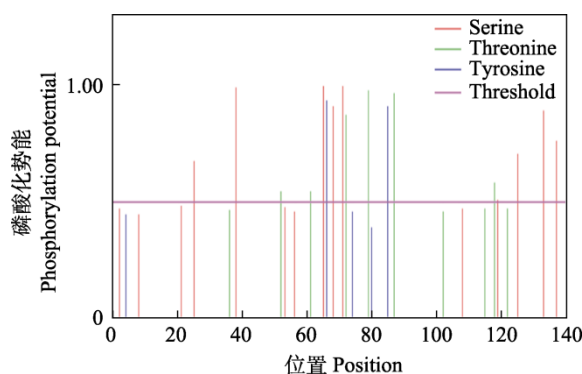


图6 LH蛋白磷酸化位点预测

Fig.6 Prediction of phosphorylation site of LH protein

2.2.5 星康吉鳗 LH 蛋白的亚细胞定位 利用 PSORT Prediction 软件预测 LH 蛋白的亚细胞定位, 结果显示, 该蛋白在细胞核、线粒体和细胞质中的可能性分别为 39.1%、26.1%和 17.4%。初步预测星康吉鳗 LH 蛋白定位于细胞核。

2.2.6 星康吉鳗 LH 蛋白的二级结构与三级结构预测

二级结构分析结果显示, LH 蛋白含有 19 个 α -螺旋, 占比 13.6%; 35 个 β -折叠, 占比 25%; 86 个无规则卷曲, 占比 61.4%。利用 AlphaFold Protein Structure Database 网站检索到星康吉鳗和其他脊椎动物 LH 蛋白的三级结构(图 7)。比较后发现, 星康吉鳗 LH 蛋白的三级结构与日本鳗鲡的 LH 蛋白三级结构较为相似, 与人(*Homo sapiens*) LH 蛋白三级结构存在一定差异。

2.3 星康吉鳗 LH 氨基酸序列同源性和系统进化分析

对星康吉鳗 LH 氨基酸序列与日本鳗鲡、欧洲鳗鲡、花鳗鲡(*A. marmorata*)等不同物种的 LH 氨基酸序列进行比对, 并绘制了多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树, 发现星康吉鳗的 LH 与鳗鲡目的欧洲鳗

鳎、花鳎、日本鳎 LH 在进化树上聚为一簇(图 8)。对星康吉鳗的 LH 氨基酸序列与多个物种的 LH 氨基酸序列同源性进行分析, 结果显示, 星康吉鳗 LH 与欧洲鳎的同源性为 92.14%, 与花鳎的同源性为 91.43%, 与日本鳎的同源性为 90.71%, 与斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性为 65.47%; 与小鼠(*Mus musculus*)同源性为 41.73%, 与原牛(*Bos taurus*)同源性为 41.73%, 与人同源性为 43.31%(表 1)。星康吉鳗的 LH 与其他硬骨鱼类同源性较高, 但与哺乳类等同源性较低, 说明 LH 在进化过程中出现了进化

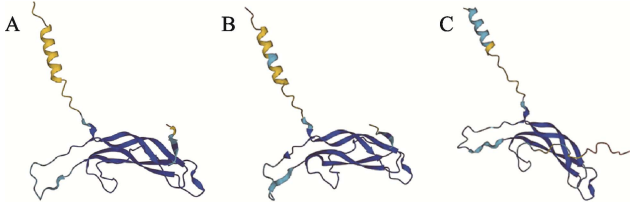


图 7 星康吉鳗和其他脊椎动物 LH 蛋白的三级预测结构
Fig.7 The predicted 3D structures of LH protein in *C. myriaster* and other vertebrates

A: 星康吉鳗; B: 日本鳎; C: 人。
A: *C. myriaster*; B: *A. japonica*; C: *H. sapiens*.

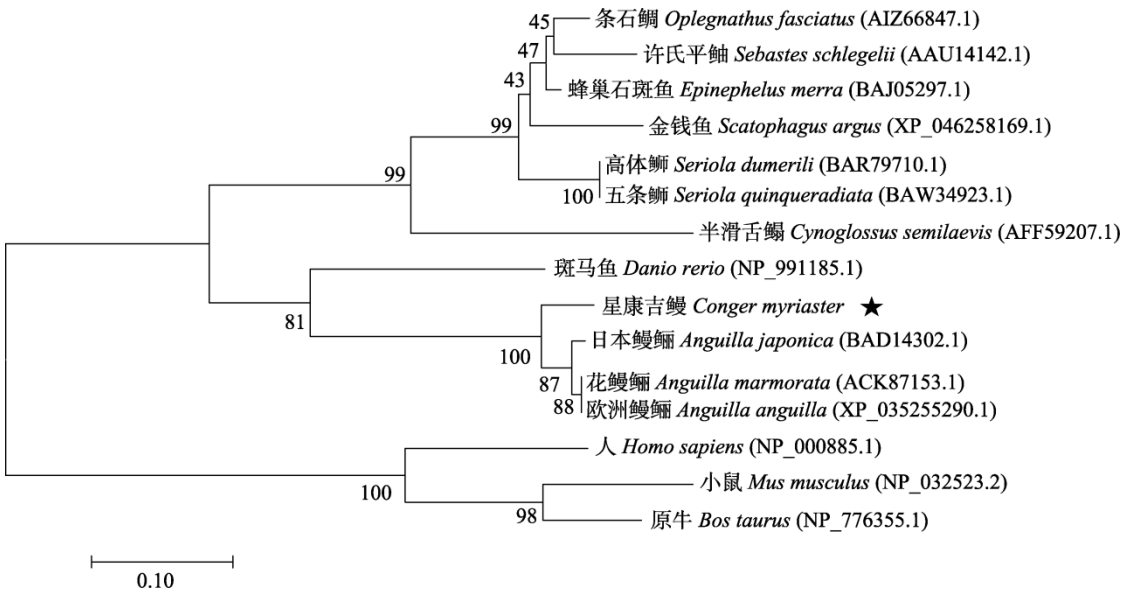


图 8 LH 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)
Fig.8 Phylogenetic tree based on LH amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

表 1 LH 氨基酸序列的同源性比对
Tab.1 Homology comparison of LH amino acid sequence

物种 Species (GenBank Accession No.)	同源性 Identity/%
欧洲鳎 <i>Anguilla anguilla</i> (XP_035255290.1)	92.14
花鳎 <i>Anguilla marmorata</i> (ACK87153.1)	91.43
日本鳎 <i>Anguilla japonica</i> (BAD14302.1)	90.71
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> (NP_991185.1)	65.47
金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i> (XP_046258169.1)	54.26
许氏平鲉 <i>Sebastes schlegelii</i> (AAU14142.1)	53.38
蜂巢石斑鱼 <i>Epinephelus merra</i> (BAJ05297.1)	52.90
高体鲷 <i>Seriola dumerili</i> (BAR79710.1)	52.90
五条鲷 <i>Seriola quinqueradiata</i> (BAW34923.1)	52.90
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i> (AIZ66847.1)	52.52
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i> (AFF59207.1)	49.64
人 <i>Homo sapiens</i> (NP_000885.1)	43.31
小鼠 <i>Mus musculus</i> (NP_032523.2)	41.73
原牛 <i>Bos taurus</i> (NP_776355.1)	41.73

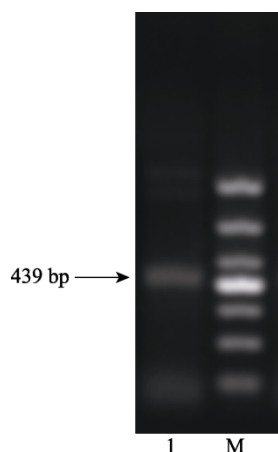


图 10 *LH* 基因插入酶切位点后的片段扩增
Fig.10 Fragment amplification of *LH* after insertion into restriction site

M: DL1000 DNA marker; 1: PCR 产物。
M: DL1000 DNA marker; 1: PCR amplification products.

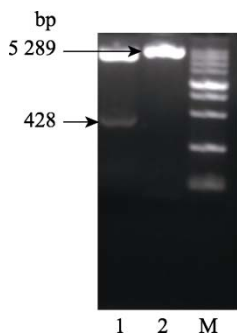


图 11 重组质粒 pEASY-T1-LH 与 pET-28a(+)载体的双酶切产物

Fig.11 Double digestion product of recombinant plasmid pEASY-T1-LH and pET-28a(+) vector

1: 重组质粒 pEASY-T1-LH 双酶切产物; 2: pET-28a(+)载体双酶切产物; M: DL5000 DNA marker。

1: Double digestion product of recombinant plasmid pEASY-T1-LH; 2: Double digestion product of pET-28a(+) vector; M: DL5000 DNA marker.

的 LH 氨基酸序列进行比对, 发现其与鳗鲡目鱼类中的欧洲鳗鲡、花鳗鲡、日本鳗鲡同源性达到 90.71%~92.14%, 与其他目鱼类 LH 的同源性为 49.64%~65.47%, 与哺乳动物同源性为 41.73%~43.31%。基于 LH 氨基酸序列同源性构建的系统发育进化树也显示, 星康吉鳗与鳗鲡目中的欧洲鳗鲡、花鳗鲡和日本鳗鲡聚为一支, 这与传统的形态学分类结果一致。N-糖基化是所有真核生物中最复杂和最普遍的蛋白质修饰, 由 N-糖基化或 O-糖基化修饰的蛋白质可调节蛋白质的生理性质, 从而调节基因组编码的天然蛋白质的功能(Lee *et al*, 2015)。糖基化是一种蛋白质翻译后修饰, 在蛋白质形成自身特有结构、维持蛋白质结构稳定及

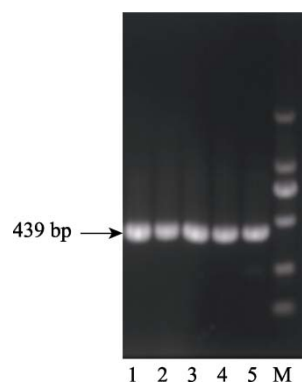


图 12 重组质粒 pET-28a-LH 培养菌液 PCR 鉴定
Fig.12 PCR identification of recombinant plasmid pET-28a-LH culture bacteria

1: 样品 1; 2: 样品 2; 3: 样品 3; 4: 样品 4; 5: 样品 5;
M: DL2000 DNA marker。

1: Sample 1; 2: Sample 2; 3: Sample 3; 4: Sample 4;
5: Sample 5; M: DL2000 DNA marker.

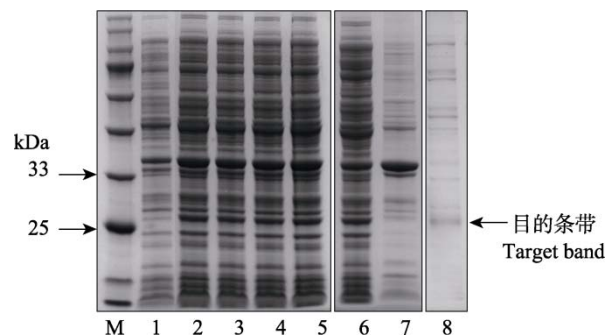


图 13 LH 重组蛋白的表达和纯化的 SDS-PAGE 检测

Fig.13 SDS-PAGE analysis of expressed and purified recombinant LH protein

M: 预染蛋白标记(11~180 kDa); 1: pET-28a(+)空载;
2~5: 0.01、0.1、0.5 和 1 mmol/L IPTG 诱导;
6: 0.5 mmol/L IPTG 诱导后上清液; 7: 0.5 mmol/L IPTG 诱导后沉淀; 8: 纯化后重组蛋白。

M: Prestained protein ladder (11~180 kDa); 1: pET-28a(+) empty; 2~5: 0.01, 0.1, 0.5, and 1 mmol/L IPTG-induced;
6: Supernatant of bacterial induction by 0.5 mmol/L IPTG;
7: Sediment of bacterial induction by 0.5 mmol/L IPTG;
8: Purification of target protein.

功能发挥等方面具有重要作用, 并会影响膜蛋白的成熟转运、细胞粘附及细胞间信号传导等(刘中静等, 2022)。硬骨鱼类的 LH 与其受体结合的能力以及异源二聚体的稳定性会随 N-糖基化位点和半胱氨酸残基的变化而受到影响(陈圣毅等, 2014; Chi *et al*, 2015)。史氏鲟(*Acipenser schrenkii*)、大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)和密斑刺鲃的 LH 氨基酸序列均存在 12 个保守的半胱氨酸残基和 1 个糖基化位点(胡红霞等, 2006; 黄小琪等, 2020; 郭煜文等, 2023)。本研究通过对 N-

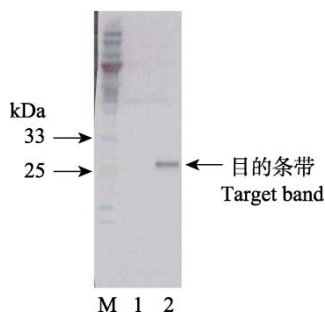


图 14 LH 重组蛋白 Western Blot 鉴定结果
Fig.14 Results of LH recombinant protein identification by Western Blot

M: 预染蛋白标记(11~180 kDa); 1: pET-28a(+);
2: LH 重组蛋白。
1: Prestained protein ladder (11~180 kDa);
2: pET-28a(+) empty; 3: LH recombinant protein.

糖基化位点分析发现,星康吉鳎 LH 的氨基酸序列中含有 1 个 N-糖基化位点,且与其他硬骨鱼类和高等脊椎动物保持高度保守性。通过多序列比对结果发现,星康吉鳎 LH 氨基酸序列含有 15 个半胱氨酸残基,与其他鳎目鱼类 LH 氨基酸序列包含的半胱氨酸残基数量相同,但与非鳎目鱼类 LH 氨基酸序列包含的半胱氨酸残基数量存在差异,进一步说明了鳎目鱼类 LH 基因在进化过程中出现特异性。

pET-28a(+)载体是一种应用广泛的表达系统,具有促进折叠、提高溶解度、便于纯化等优点,可以产生大量的蛋白质(Baciu *et al.*, 2023)。pET-28a(+)载体表达的蛋白质由蛋白标签和目的蛋白连接在一起,称为融合蛋白,其蛋白标签为 His-tag 和 T7-tag,相对分子质量约 10 kDa (李文桂等, 2010)。在使用 pET-28a(+)载体对金钱鱼 LH 进行原核表达的实验中, Western Blot 检测结果显示 LH 重组蛋白的相对分子质量在 15.0~16.0 kDa 之间,表明 LH 蛋白已成功表达(Zhang *et al.*, 2018)。本研究首次通过 pET-28a(+)载体与星康吉鳎 LH 基因构建了重组质粒 pET-28a-LH, 实现了星康吉鳎 LH 蛋白的体外原核重组表达,经 Western Blot 检测结果显示,星康吉鳎 LH 重组融合蛋白在约 26.5 kDa 的位置有 1 条特异性结合条带,因 LH 重组融合蛋白中插入了 His-tag 和 T7-tag 标签,故除去标签后 LH 蛋白表达的相对分子质量约为 16.5 kDa,比预测的相对分子质量大 1 kDa 左右。已有研究证明,重组蛋白的相对分子质量比预计的偏大,推测其原因可能是糖基化对重组蛋白的电泳迁移有影响(Chen *et al.*, 2012)。因此,本研究中星康吉鳎 LH 重组融合蛋白已经通过原核表达系统成功表达,为后续开展星康吉鳎 LH 蛋白的离体实验以及在体实验奠定了基础。

本研究在实验过程中发现,采用 BL21(DE3)感受态细胞作为宿主菌无法成功表达星康吉鳎的 LH 重组融合蛋白。在原核表达系统中,基因中成串或多个大肠杆菌(*Escherichia coli*)稀有密码子的存在,是外源蛋白不表达或低表达量的重要影响因素之一(李月红等, 2012)。对本研究克隆得到的 LH 基因序列进行稀有密码子分析,其 CAI 值为 0.66,小于 0.80,且存在连续的稀有密码子,这可能会影响 LH 蛋白在大肠杆菌中的表达。Rosetta (DE3)感受态细胞是通过 BL21 (DE3)感受态细胞优化产生的,该菌株有一个相容性氯霉素抗性质粒补充大肠杆菌稀有密码子 AUA、AGG、AGA、CUA、CCC 和 GGA 的 tRNA,可增强真核蛋白表达(脱萍等, 2021)。因此,本研究选用经过修饰后的专用于表达大肠杆菌稀有密码子的 Rosetta(DE3)感受态细胞,从而高效地表达了可溶性的 LH 重组融合蛋白。在对 Mx (Myxovirus resistance) 基因原核表达的结果中表明,目的蛋白在 Rosetta (DE3)感受态细胞中检测到了表达,而在 BL21(DE3)感受态细胞中未检测到表达(尹春光等, 2009),该结果与本实验结果相一致。在海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*) CXCL8 基因的原核表达中, Rosetta(DE3)感受态细胞中目的蛋白表达量明显高于 BL21(DE3)感受态细胞(朱欣云等, 2018)。DAB₃₈₉ IL-2 蛋白在原核表达过程中同样发现, BL21(DE3)感受态细胞不能对其进行表达,而 Rosetta(DE3)感受态细胞是正确表达该蛋白的合适菌株(Zarkar *et al.*, 2020)。本研究使用 Rosetta(DE3)感受态细胞成功表达了星康吉鳎的 LH 重组融合蛋白,为后续原核表达过程中表达感受态细胞的选择提供了思路。

目前,大肠杆菌已被有效地用于大量重组蛋白的生产,然而,在表达过程中由于蛋白质的错误折叠和聚集而导致包涵体,虽然包涵体的形成便于分离和防止蛋白质水解,但其需要用高浓度的变性剂进行溶解,且变性裂解后较难复性,导致具有生物活性的蛋白总产量很低,故通常对诱导条件进行优化来避免包涵体的产生,从而形成可溶性的蛋白(Kim *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014)。另有研究表明,低温下的蛋白表达往往能显著提高重组蛋白的溶解度(Francis *et al.*, 2010)。本研究对 LH 重组融合蛋白诱导表达的温度、时间、IPTG 浓度均进行了优化,最终通过 16 °C、16 h 成功表达出可溶性的 LH 重组融合蛋白。Kim 等(2013)优化了重组人生长激素蛋白的原核表达条件,确定 16 °C 诱导 16 h 为最佳诱导条件。在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) LH 蛋白的原核表达研究中同样发现,16 °C 诱导条件下目的蛋白呈可溶性(张李敏, 2022)。本研究还发现,

在不同浓度 IPTG 条件下蛋白的表达量无明显差异。凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)的原核表达研究显示,一定浓度范围内的 IPTG 对表达无明显影响,0.1~1 mmol/L IPTG 适用于重组载体的诱导表达(吴任等,2006)。脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)热休克蛋白 90 (HSP90)原核表达过程中发现,随着 IPTG 浓度的增加,目的蛋白占菌体总蛋白的比例无明显差异(韩俊英等,2011)。本研究结果对原核表达制备可溶性蛋白样品提供了参考,也为后续进一步研究星康吉鳗 LH 蛋白的功能奠定了基础。

4 结论

本研究成功克隆了星康吉鳗 LH 基因的 CDS 区序列,并对其氨基酸序列进行生物信息学分析,构建了重组质粒 pET-28a-LH,通过转化 Rosetta (DE3)感受态细胞经 IPTG 诱导成功表达了分子质量单位约为 26.5 kDa 的 LH 重组融合蛋白,除去载体表达的融合标签部分,实际表达的蛋白约为 16.5 kDa,这与预测大小相符。经 Western Blot 检测结果显示,该重组融合蛋白可以被 His 抗体特异性识别,表明携带 6×His 标记的 LH 重组融合蛋白成功表达。

参 考 文 献

- AIZEN J, SHARMA S, ELIZUR A, *et al.* Regulation of steroid production and key genes in catfish *Heteropneustes fossilis* using recombinant gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2023, 49(5): 911–923
- BACIU D D, DINU S, PALADE B, *et al.* Comparison of truncated human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) expression in pET28a(+) versus pET-SUMO vector and two *Escherichia coli* strains. *Advances in Medical Sciences*, 2023, 68(1): 61–70
- CHEN J, ZHANG Y H, TANG Z G, *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. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 178(2): 237–249
- CHEN S Y, LIU X Z, SHI B, *et al.* Cloning and expression pattern of gonadotropin hormone β (FSH, LH) subunit in *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(10): 1673–1686 [陈圣毅, 柳学周, 史宝, 等. 条石鲷促性腺激素 β (FSH, LH) 亚基 cDNA 克隆及表达特性分析. *水产学报*, 2014, 38(10): 1673–1686]
- CHI M L, NI M, LI J F, *et al.* Molecular cloning and characterization of gonadotropin subunits (GTH α , FSH β and LH β) and their regulation by hCG and GnRHa in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) *in vivo*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(3): 587–601
- DEGANI G, GOLDBERG D, TZCHORI I, *et al.* Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH-beta subunit, and expression of FSH-beta and LH-beta in males and females after sex determination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 136(2): 283–293
- FAKRIADIS I, MEIRI-ASHKENAZI I, BRACHA C, *et al.* Gonadotropin expression, pituitary and plasma levels in the reproductive cycle of wild and captive-reared greater amberjack (*Seriola dumerili*). *General and Comparative Endocrinology*, 2024, 350: 114465
- FRANCIS D M, PAGE R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 2010, Chapter 5(1): 5.24.1–5.24.29
- GAO Y H. Physiological functions of pituitary gonadotropin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2021 [高云红. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 垂体促性腺激素生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2021]
- GUO Y W, LI Y K, DAI M S, *et al.* Cloning and expression analysis of *fsh β* and *lh β* gene in *Diodon hystrix*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2023, 54(6): 1775–1785 [郭煜文, 李奕凯, 戴明姝, 等. 密斑刺鲀 (*Diodon hystrix*) *fsh β* 和 *lh β* 基因的克隆及表达分析. *海洋与湖泊*, 2023, 54(6): 1775–1785]
- HAN J Y, LI J, LI J T, *et al.* High level prokaryotic expression and identification of heat shock protein 90 in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(5): 44–50 [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]
- HU H X, ZHANG Y, LIU X C, *et al.* cDNA cloning, phylogenetic analysis of two gonadotropins β subunits sequences of Amur sturgeon. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(2): 362–375 [胡红霞, 张勇, 刘晓春, 等. 史氏鲟两种促性腺激素 β 亚基 cDNA 克隆及序列进化分析. *动物学报*, 2006, 52(2): 362–375]
- HUANG X Q, ZHONG D M, HE P Y, *et al.* Cloning and tissue expression of luteinizing hormone (LH) gene in *Mastacembelus armatus*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(7): 1706–1713 [黄小琪, 钟东明, 何佩莹, 等. 大刺鲃促黄体生成素基因克隆及其组织表达分析. *南方农业学报*, 2020, 51(7): 1706–1713]
- KIM M J, PARK H S, SEO K H, *et al.* Complete solubilization and purification of recombinant human growth hormone produced in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56168
- LEE H S, QI Y F, IM W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*,

- 2015, 5: 8926
- LI W G, XIAO B Z, LUO X J, *et al.* Construction and expression of the recombinant plasmid pET28 α -Sj32 of *Schistosoma japonicum* in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Journal of Pathogen Biology*, 2010, 5(4): 286–289 [李文桂, 肖邦忠, 罗兴建, 等. 日本血吸虫重组质粒 pET28 α -Sj32 的构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达. *中国病原生物学杂志*, 2010, 5(4): 286–289]
- LI Y H, FU Y H, WANG Y Z, *et al.* Prokaryotic expression and identification of nucleoprotein of spring viremia of carp virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(4): 323–325 [李月红, 付云红, 王永志, 等. 鲤春病毒血症病毒核蛋白的原核表达及初步鉴定. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(4): 323–325]
- LIU X Z, ZANG K, XU Y J, *et al.* Molecular cloning and differential expression of LH β subunit during the ovarian maturation cycle of *Paralichthys lethostigma*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 22–31 [柳学周, 臧坤, 徐永江, 等. 漠斑牙鲈(*Paralichthys lethostigma*)LH β 基因克隆及其在卵巢不同发育期的表达特征. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 22–31]
- LIU Z J, QIAO L, YE Z Y, *et al.* Identification of the glycosylation sites of Opsin3 and its glycosylation modification function. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(3): 1173–1182 [刘中静, 乔里, 叶朝阳, 等. Opsin3 糖基化位点的鉴定及糖基化修饰功能. *生物工程学报*, 2022, 38(3): 1173–1182]
- MOLÉS G, HAUSKEN K, CARRILLO M, *et al.* Generation and use of recombinant gonadotropins in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 299: 113555
- NGUYEN M T, KOO B K, THI VU T T, *et al.* Prokaryotic soluble overexpression and purification of bioactive human growth hormone by fusion to thioredoxin, maltose binding protein, and protein disulfide isomerase. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89038
- NYUJI M, HAMAGUCHI M, SHIMIZU A, *et al.* Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assays for chub mackerel *Scomber japonicus* gonadotropins and regulation of their secretion in female reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 2022, 328: 114103
- RAMOS-JÚDEZ S, GIMÉNEZ I, GUMBAU-POUS J, *et al.* Recombinant Fsh and Lh therapy for spawning induction of previtellogenic and early spermatogenic arrested teleost, the Flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 6563
- SHI B, LIU X Z, XU Y J, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- SHI B, WANG C G, TANG X H, *et al.* A study on sperm ultrastructure in the whitespotted *Conger*, *Conger myriaster*. *Marine Sciences*, 2023, 47(10): 112–120 [史宝, 王成刚, 汤晓华, 等. 星康吉鳗精子的超微结构研究. *海洋科学*, 2023, 47(10): 112–120]
- SUZUKI H, KAZETO Y, GEN K, *et al.* Functional analysis of recombinant single-chain Japanese eel Fsh and Lh produced in FreeStyle 293-F cell lines: Binding specificities to their receptors and differential efficacy on testicular steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 285: 113241
- TUO P, XIE X, YU G H, *et al.* Prokaryotic expression and mass spectrometry determination of IAG gene in *Portunus trituberculatus*. *Journal of Biology*, 2021, 38(5): 17–22 [脱萍, 谢熙, 喻国洪, 等. 三疣梭子蟹 IAG 基因的原核表达及质谱鉴定. *生物学杂志*, 2021, 38(5): 17–22]
- WU R, XIE S T, SUN Y, *et al.* High level prokaryotic expression of heat shock protein 70 in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 305–309 [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]
- YANG H, SHI B, NIU H X, *et al.* Advances and future prospects in *Conger myriaster* research. *Marine Sciences*, 2020, 44(6): 152–158 [杨浩, 史宝, 牛化欣, 等. 星康吉鳗生物学与生态学的研发现状与展望. *海洋科学*, 2020, 44(6): 152–158]
- YIN C G, DU L X, ZHAO G P, *et al.* Optimizing the expression of Mx gene in *Escherichia coli* based on rare Codon and mRNA structure. *Hereditas*, 2009, 31(1): 75–82 [尹春光, 杜立新, 赵桂平, 等. Mx 基因稀有密码子和 mRNA 结构及大肠杆菌表达优化. *遗传*, 2009, 31(1): 75–82]
- ZARKAR N, ALI NASIRI KHALILI M, KHODADADI S, *et al.* Expression and purification of soluble and functional fusion protein DAB₃₈₉IL-2 into the *E. coli* strain Rosetta-gami (DE3). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(2): 206–212
- ZHANG D Y, XU S L, WANG Y J, *et al.* The development of gonads and changes of gonadotropin in silver pomfret *Pampus argenteus*. *Thalassas: an International Journal of Marine Sciences*, 2024, 40(1): 91–100
- ZHANG G, WANG W, SU M L, *et al.* Effects of recombinant gonadotropin hormones on the gonadal maturation in the spotted scat, *Scatophagus argus*. *Aquaculture*, 2018, 483: 263–272
- ZHANG L M. Effects of gonadotropin and receptor on oocytes of *Micropterus salmoides*. Master's Thesis of Henan Normal University, 2022 [张李敏. 大口黑鲈促性腺激素及受体在卵母细胞中的作用. 河南师范大学硕士研究生学位论文, 2022]
- ZHAO X Y, SHI B, WANG C B, *et al.* Effects of dietary supplementation of compound probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal digestive enzyme, and microbiota of whitespotted *Conger* (*Conger myriaster*) in recirculating aquaculture system. *Aquaculture International*, 2024, 32(3): 2713–2738

ZHAO X Y, SHI B, WANG C G, *et al.* Effects of feeding frequency on the growth, physiological indices, and water quality of *Conger myriaster* reared in industrial recirculating aquaculture systems. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(2): 233–244 [赵新宇, 史宝, 王成刚, 等. 投喂频率对工厂化循环水养殖星康吉鳗生长、生理指标及其水质的

影响. *渔业科学进展*, 2024, 45(2): 233–244]

ZHU X Y, DING S Q, ZHANG Z, *et al.* Prokaryotic expression and purification of CXCL8 from *Petromyzon marinus*. *Marine Fisheries*, 2018, 40(1): 47–56 [朱欣云, 丁少青, 张哲, 等. 海七鳃鳗 CXCL8 基因的原核表达及蛋白纯化. *海洋渔业*, 2018, 40(1): 47–56]

(编辑 冯小花)

LH Gene Cloning, Sequence Feature Analysis and Prokaryotic Expression in *Conger myriaster*

CHEN Yan^{1,2}, SHI Bao^{1①}, WANG Chenggang³, BO Wanjun¹, YAN Kewen¹,
TAO Meijun¹, ZHAO Xinyu¹, MA Xiaodong¹

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods;

Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;
Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center;
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. Haiyang Yellow Sea Aquatic Product Co., Ltd., Yantai 265100, China)

Abstract *Conger myriaster* is an economic valuable fishery resources in the seas surrounding China, Korea, and Japan. *C. myriaster* presents an important fishing target in Chinese fishery. However, due to intense human fishing activities, *C. myriaster* populations have been declining steadily. Consequently, safeguarding this species has become imperative. The luteinizing hormone (LH) gene plays an important role in gamete maturation, ovulation, and steroid hormone synthesis in fish. However, the expression of reproductive axis genes and the regulation of reproductive-related hormones, specifically in *C. myriaster*, are not well understood. In this study, the coding sequence (CDS) of the LH gene was cloned using PCR techniques. The LH gene structure and characteristics were bioinformatically analyzed. The CDS of the LH gene consisted of 423 bp and encoded 140 amino acids. By analyzing the physical and chemical properties of the protein, the LH protein molecular weight was 15.56 kDa. The aliphatic index was 73.71 and the theoretical pI was 5.85. Based on an instability index value of 66.49, the LH protein exhibits a state of instability. Using functional domain analysis, we found that the LH protein possessed a highly conserved GHB characteristic domain (composed of 105 amino acids at 27–132). Hydrophilicity and hydrophobicity analysis of the protein revealed that the LH protein is hydrophilic. The 16th amino acid (Cys) exhibited the strongest hydrophobicity (2.233), while the 65th amino acid (Ser) exhibited the strongest hydrophilicity (–2.333). Through the signal peptide analysis and transmembrane domain analysis of LH protein, the first 1–22 amino acids function as signal peptides without containing any transmembrane domain. According to the analysis of protein glycosylation sites, the LH protein contain 1 N-glycosylation site and 3 O-glycosylation sites. The LH protein contain 17 potential phosphorylation sites. Specifically, there are 9 Serine (Ser), 6 Threonine (Thr), and 2 Tyrosine (Tyr) phosphorylation sites. Subcellular localization analysis revealed that the LH protein was mainly localized in the nucleus. The secondary structure of the LH protein mainly consists of α -helix (13.6%), β -sheet (25%), and random coil

① Corresponding author: SHI Bao, Email: shibao@ysfri.ac.cn

(61.4%). Upon comparing the tertiary structure of the LH protein with that of *Anguilla japonica* and *Homo sapiens*, the tertiary structure of the LH protein was similar to that of *A. japonica*. However, certain differences were found compared to the tertiary structure of *H. sapiens*. Based on the sequence alignment and phylogenetic analysis, LH in *C. myriaster* exhibited a closer evolutionary relationship with *A. anguilla*, *A. marmorata*, and *A. japonica*. Compared with *A. anguilla*, *A. marmorata*, and *A. japonica*, the *C. myriaster* LH amino acid sequence revealed the similarities of 92.14%, 91.43% and 90.71%, respectively. In addition, the LH amino acid sequence of *C. myriaster* compared with *H. sapiens*, *Mus musculus* and *Bos taurus* revealed the similarities of 43.34%, 41.73% and 41.73%, respectively. The LH of *C. myriaster* exhibits high homology with other teleosts, but displays low homology with mammals, which indicates that LH has evolutionary differences during evolution. In this study, we present the successful production of recombinant *C. myriaster* LH protein using the pET-28a(+) expression system. The restriction site *Nde* I / *Xho* I was inserted at both ends of LH fragment. The 439 bp fragment of LH was amplified using RT-PCR. Subsequently, the fragment was cloned into the pEASY-T1 vector to obtain recombinant plasmids, which was designated as pEASY-T1-LH. The recombinant plasmid pEASY-T1-LH and the pET-28a(+) vector were double-digested using *Nde* I / *Xho* I enzymes. After double-digested, the fragment was successfully cloned into the pET-28a(+) vector to obtain recombinant plasmids, which was designated as pET-28a-LH. In order to investigate the biological activities and physiological significance of pET-28a-LH, we used the pET protein fusion and purification system to produce pET-28a-LH in Trans1-T1 competent cell. Recombinant plasmids (pET-28a-LH) were transferred into Rosetta (DE3) cells, which were cultured under different IPTG induction conditions (0.01, 0.1, 0.5 and 1 mmol/L) at a temperature of 16 °C for 16 h. LH could be efficiently expressed across various IPTG concentrations and under the aforementioned induction conditions. Consequently, the subsequent experiments were conducted using the following optimized parameters: an IPTG concentration of 0.5 mmol/L, incubation at 16 °C for a duration of 16 h. The precipitate (insoluble fraction) was resuspended in lysis buffer. The supernatant and precipitate were analyzed by SDS-PAGE following induction of expression. SDS-PAGE analysis revealed the presence of distinct 26.5 kDa bands for the LH protein, which were soluble and present in the clear supernatant. Western blot analysis revealed that histidine tagged LH protein reacted with anti-His antibody, LH protein yielded clear bands of 26.5 kDa were detected. The observed size is in accordance with the anticipated molecular weight expression, indicating successful expression of the fusion protein carrying 6×His tag. The protein was purified using a His-tagged nickel affinity chromatography column. This result establishes a solid foundation for future utilization of recombinant LH protein in inducing sexual maturity in cultured *C. myriaster*, while also providing valuable insights into unraveling the regulatory mechanisms underlying LH gene-mediated steroidogenesis in *C. myriaster*.

Key words *Conger myriaster*; Luteinizing hormone gene; Gene cloning; Sequence feature analysis; Prokaryotic expression