

文章编号:1000-0615(2010)05-0656-08

DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.06721

## 罗非鱼 AMH 基因的原核表达及多克隆抗体制备

丁炜东, 曹哲明, 曹丽萍\*

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,农业部水生动物遗传育种和  
养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081)

**摘要:** 抗苗勒氏管激素 (anti-mullerian hormone, AMH), 也称苗勒氏管抑制物质 (mullerian inhibiting substance, MIS), 为肽类生长因子, 属于 TGF- $\beta$  生长和分化因子家族。为研究 AMH 对奥利亚罗非鱼性腺发育的作用, 应用 DNASTAR 软件分析罗非鱼 AMH 基因的抗原性, 选择抗原性较强的 22~243 氨基酸作为目的片段构建了 AMH 的原核表达载体并进行融合表达。首先利用 RT-PCR 方法从性腺中扩增出长约 663 bp 的目的序列 AMH 基因, 克隆至 T 载体中, 经酶切鉴定和序列测定分析确认序列的正确性后将此片段克隆到表达载体 pGEX-5x-1 中构建重组表达质粒 pGEX-AMH, 并在大肠杆菌 BL21 中获得了高表达, 目的蛋白约占菌体总蛋白的 38.7%。菌体经溶菌酶裂解, 制备无细胞抽提液, GSTrap FF column 柱层析后得到分子量为 49 ku 单一条带的目的蛋白。目的蛋白经 FactorXa 酶切裂解, GSTrap FF column 过柱纯化后得到纯化的 AMH 蛋白, 分子量为 26 ku, 浓度为 2.6 mg/mL。以每只 20  $\mu$ g 的剂量 4 次免疫 ICR 小鼠, 免疫小鼠可以检测到特异性针对 AMH 蛋白的血清抗体应答, 免疫组抗体水平显著高于空白组 ( $P < 0.05$ ), 且加强免疫第 5 周后抗体效价为  $0.672 \pm 0.411$ , 达到峰值, 血清效价为 1:2 000。试验结果表明表达产物具有免疫原性, 可以刺激机体产生免疫应答。

**关键词:** 奥利亚罗非鱼; 抗苗勒氏管激素; 原核表达; 抗血清; 纯化

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

抗苗勒氏管激素 (anti-mullerian hormone, AMH), 也称苗勒氏管抑制物质 (mullerian inhibiting substance, MIS), 属于 TGF- $\beta$  生长和分化因子家族。在胚胎发育过程中, AMH 和雄激素是调节雄性内、外生殖器分化的两个重要因素。二十世纪八十年代, AMH 由 Picard<sup>[1]</sup> 等从牛胚胎的睾丸中克隆提取, 之后其受体基因也从兔、鼠及人类中克隆提取, 其功能逐渐被研究认识。人类男性的 AMH 的表达一直持续到雄性生殖系统中导管系统的形成, 女性则从怀孕 36 周就开始分泌 AMH<sup>[2]</sup>, 老鼠则从出生的第 6 天开始合成 AMH<sup>[3]</sup>。AMH 主要由睾丸支持细胞和卵巢颗粒细胞分泌, 具有抑制雄性苗勒氏管发育、调节两性生殖细胞和性腺发育的重要作用。

在睾丸中 AMH 主要表现为抑制莱迪希细胞

的增殖和细胞色素 P450 类固醇生成酶 CYP11 和 CYP17 的表达<sup>[4]</sup>, 在雌性中, AMH 阻止了原卵泡的形成和降低了卵泡刺激素的分泌<sup>[5-6]</sup>。体外试验证明 AMH 的在子宫中的作用受到促黄体激素 (LH) 受体和 P450 芳香化酶的下降调节<sup>[7-8]</sup>。近二十年来, AMH 的研究主要集中在哺乳动物和鸟类中, 而在硬骨鱼类中对其的研究还没有完全开展, 起初 AMH 在硬骨鱼类中是否存在也是值得怀疑的, 毕竟在现代硬骨鱼类中并没有苗勒氏管。然而 2002 年夏, 一个从日本鳗鲡中发现的精子发生激素 [spermatogenesis related substance (eSRS21)]<sup>[9]</sup> cDNA 与哺乳动物和鸟类 AMH 具有较低的同源性, 但是它在性腺发育过程中的表达模式和作用却与哺乳动物的 AMH 非常相似。随后的功能研究表明它是与哺乳动物 AMH 具有

收稿日期: 2009-11-26

修回日期: 2010-03-08

资助项目: 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2009JBF001)

通讯作者: 曹丽萍, E-mail: caolp@ffrc.cn

较高的同源性。从那以后,一系列类似于哺乳动物、爬行动物、鸟类的 AMH 被克隆出来,如大西洋鲑(GenBank accession number AY722411)、日本青鳉<sup>[10]</sup>、斑马鱼<sup>[11]</sup>、日本鳗鲡(GenBank accession number AY899282)等。

奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*)属于鲈形目、鲷鱼科,具有繁殖周期短,生长速度快,抗逆性强等特点,是热带和亚热带地区重要的淡水经济鱼种,在淡水养殖业中占有重要的地位。但是它也存在性成熟提早,过度繁殖等问题,因此对性腺发育具有调节作用的 AMH 成为研究的一个方向。在前期实验中,我们已经克隆了 AMH 的基因全长并对其时空表达特征进行了研究<sup>[12]</sup>,为进一步研究 AMH 在奥利亚罗非鱼性腺发育过程中的作用,我们采用 RT-PCR 方法克隆出奥利亚罗非鱼 AMH 基因 cDNA,将其抗原性较强的部分序列克隆入原核表达系统中,得到重组表达质粒,在大肠杆菌中以 IPTG 诱导表达得到 AMH 融合蛋白,进一步制备了抗血清,为下一步采用免疫组化等方法研究 AMH 基因在罗非鱼卵巢与精巢中的生理功能并加以应用打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**实验材料** 实验用奥利亚罗非鱼取自淡水中心渔场,组织为丘脑。小鼠购自浙江大学实验动物中心的 ICR 小鼠。

**试剂** AMV 反转录试剂盒、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶、EcoR I、Hind III 等购自大连宝生物公司,聚丙烯酰胺、RNase 抑制剂等购自上海生工生物工程公司,Factor Xa、GSTrap FF column 柱、抗谷胱甘肽(GST)单抗均购自纽英伦生物技术(北京)公司,其他生化试剂均为国产分析纯。弗氏完全、不完全佐剂,ELISA 反应板等均购自上海申能博彩生物有限公司。

**仪器** PCR 仪购自 BioRad 公司,实验结果记录和蛋白分析使用的是柯达公司的凝胶成像系统,DNA 序列分析使用 DNASTAR 软件,全自动测序工作由上海生工生物工程公司完成。酶标测定仪购自 TECAN 公司。

**质粒与菌株** pMD18-T 载体购自大连宝生物公司,表达质粒 pGEX-5x-1 为本室保存,受

体细菌 DH5 $\alpha$  和 JM109 由本室保存。

### 1.2 方法

**引物设计与 RT-PCR 反应** 采用 Primer 5.0 设计了一对特异性引物,并在两端分别加上 EcoR I、Hind III 酶切位点,引物由上海捷瑞生物有限公司合成。

引物 1:5'-GGAATTCATGGGACCCACAGTAACCGAGTAC-3'

引物 2:5'-CCCAAGCTTGGGGCCTGAAGCACATCTCGTATCAG-3'

反转录引物 AP 购自上海生工生物工程公司。

以提取自罗非鱼的性腺总 RNA 为模板进行反转录合成第一链 cDNA,以反转录产物为模板及合成的上下游引物进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 预变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,72 °C 延伸 7 min。

**PCR 产物的克隆与鉴定** PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后用凝胶回收试剂盒回收,将回收产物与 pMD18-T 载体连接过夜,连接产物转化大肠杆菌 JM109,随机挑取细菌,提取质粒后以 EcoR I、Hind III 双酶切初步鉴定后,将阳性克隆送交上海生工进行 DNA 测序。测序结果用 DNASTAR、CLUSTAL X 等软件进行分析。

**原核表达载体的构建** 将阳性克隆 pMD18-T-AMH 与原核表达质粒 pGEX-5x-1 分别用 EcoR I、Hind III 37 °C 双酶切,用凝胶回收试剂盒回收 AMH 片段和线性化 pGEX-5x-1 质粒,按照 T4 DNA 连接酶的说明书设计连接反应体系,构建表达质粒 pGEX-AMH,并转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性克隆,随机挑取 2 个克隆进行酶切鉴定。

**目的基因在大肠杆菌中的表达、鉴定** 将表达质粒 pGEX-AMH 和空载体质粒 pGEX-5x-1 分别转化 DH5 $\alpha$  菌株,转化菌在含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 2  $\times$  YT 培养基中 37 °C 振荡培养过夜。按 1:100 接种扩大培养,37 °C 振荡培养大约 4 h 左右。直至 OD<sub>600 nm</sub> 值在 0.6 左右,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.3 或 1 mmol/L,继续 37 °C 轻度振荡培养 4 h,4 °C 离心(5 000 r/min,5 min)收集菌体。用适量的 1  $\times$  PBS 洗涤沉淀两次,最后加入适量的 1  $\times$  PBS 将菌体重新悬浮。

在菌体的悬浮物中加入等体积的  $2 \times$  SDS 凝胶加样缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl pH 6.8; 200 mmol/L 二硫苏糖醇; 4% SDS; 0.2% 溴酚蓝; 20% 甘油)。将样品置于沸水中煮沸 5 min, 以使蛋白质充分变性。并进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕后, 小心剥下凝胶, 并置于考马斯亮蓝 R-250 中染色。参照《分子克隆》<sup>[13]</sup> 及试剂手册进行蛋白质印迹确定蛋白的表达。

**融合蛋白的获得、纯化及裂解** 取过夜培养的 10 mL 细菌于 1L LB (含葡萄糖) 中, 37 °C 摇瓶培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 再继续培养 2 h, 4 000 × g 离心 20 min 收集菌体, 重悬于 50 mL 柱缓冲液中。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL, 冰浴 30 min。最后加入 DNA 酶和 RNA 酶至终浓度为 5 μg/mL, 4 °C 孵育 10 min。9 000 × g 离心 30 min, 将上清转移备用, 上清即为表达的融合蛋白。

将上清蛋白质上样于平衡缓冲液 (1 × PBS (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) 平衡好的 GSTrap FF column 亲和柱, 用缓冲液平衡后, 开始用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L reduced glutathione, pH 8.0) 洗脱, 洗脱液中即为纯化后的融合蛋白, 最后 SDS-PAGE 电泳检测。在洗脱液中以 10 IU/mg 加入 Factor Xa, 室温孵育 2 ~ 16 h, 当蛋白酶切完全后, 将样品上样平衡好的 GSTrap FF column 柱, 洗脱液洗脱后即得到目的蛋白, 最后以 HiTrap Benzamidine FF 柱去除 Factor Xa。SDS-PAGE 电泳检测最终产物 AMH 蛋白。

**表达产物抗血清的制备** 将回收的蛋白与适量的 1 × PBS 混合后, 取 0.2 mL (约 20 μg 的抗原) 腹腔注射 2 只雌性 BALB/c 小鼠 (4 ~ 5 周龄), 在免疫小鼠之前, 先采集血样, 将来可作为阴性血清。每两周免疫一次, 第二次免疫后 14 天采血 (小鼠在采血前数小时应予以禁食)。采集血样收集于经灭菌的、不含抗凝剂的离心管中。于 4 °C 放置过夜, 使之凝固。析出淡黄色抗血清。将抗血清转移至另一管中, 血凝块以 1 500 × g 离心 10 min。吸出上清液合并于收集的抗血清管中。

抗血清部分保持于 -70 °C, 部分保持于 -20

°C (备用)。

**抗血清效价的测定** 采用酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA): 将抗原稀释于包被缓冲液 (0.1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.6) 中, 终浓度为 5 ng/μL, 每孔加 50 μL。并设立空白对照 (只加包被缓冲液)。4 °C 包被过夜后。用 1 × PBST [1 × PBS + (0.1%) Tween 20] 于室温下洗涤 3 次, 每次 5 min。然后每孔加 200 μL 封闭液 (10% 的小牛血清溶于 1 × PBS 中), 4 °C 封闭过夜。1 × PBST 洗涤 3 次。加入一抗, 血清样品按 1:100; 1:200 倍比稀释于 1 × PBS 中, 每孔 100 μL, 阴性孔加入 100 μL 1:200 阴性血清, 空白孔加入 100 μL 1:100 样品血清。37 °C 孵育 2 h。1 × PBST 洗涤 3 次。加入酶标二抗, 酶标二抗按说明书, 1:1 000 稀释于 1 × PBS 中, 每孔 50 μL, 37 °C, 2 h。显色, 显色液 [5 mg OPD (邻苯二胺); 4 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10 mL 底物缓冲液 (0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 mol/L 柠檬酸钠)], 每孔 100 μL, 37 °C, 至阴性孔显色时, 加入 50 μL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止。酶标仪上判读结果。

## 2 结果

### 2.1 抗原性分析

采用生物学软件 DNASTar 对 AMH 蛋白的氨基酸序列进行抗原性分析, DNASTar 软件包中 Protean 是功能强大的蛋白分析软件, 其具体功能和优势有: 分析和预测蛋白质结构, 提供各种分析方法并以图形的格式输出结果, 显示蛋白质分子的各种理化特性以及抗原决定簇等功能区的预测功能。通过分析, 可见 AMH 蛋白的 22 ~ 243 氨基酸抗原指数较高, 可作为原核表达的目的片段。采用 PRIMER 5.0 引物设计软件, 以 AMH 全长基因为模板, 设计一对含 *Eco*R I、*Hind* III 酶切位点的引物来扩增目的片段。

### 2.2 AMH 目的片段的克隆

以罗非鱼性腺提取的总 RNA 作反转录模板, 经 RT-PCR 获得了 AMH 基因抗原性较高的目的片段。RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳表明, 扩增到了大约 600 bp 左右的目的片段 (图 1), 电泳结果显示片段明亮、清晰, 没有弥散带, 说明引物特异性高, PCR 扩增结果较佳。

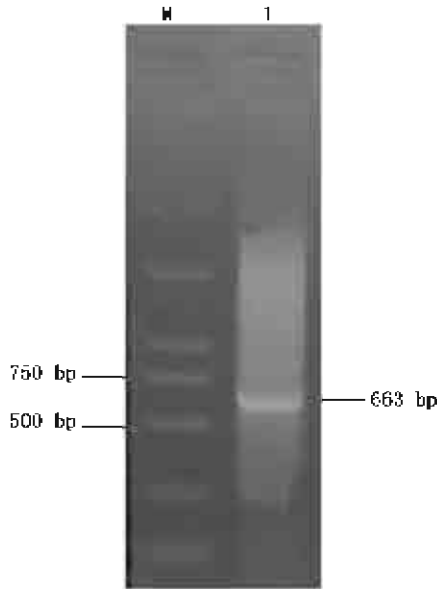


图1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳  
M; DNA 分子量标记; 1; RT-PCR 产物。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

M; DNA molecular markers; 1; RT-PCR product.

### 2.3 重组质粒 pMD18-T-AMH 和 pGEX-AMH 的构建及酶切鉴定。

重组质粒 pMD18-T-AMH 构建及酶切鉴定  
将候选的重组质粒 pMD18-T-AMH 转化大肠杆菌 JM109 菌株后,随机挑取 10 个克隆提取质粒,提取的质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切(图 2),酶切结果表明 pMD18-T-AMH 酶切后有一条约 600 bp 的条带,说明 AMH 成功克隆入 T 载体中,将重组质粒 pMD18-T-AMH 送测序公司测序,测序结果表明成功的克隆到大小为 663 bp 的目的片段,适合下一步表达载体的构建。

#### 重组质粒 pGEX-AMH 的构建及酶切鉴定

提取重组质粒 pMD18-T-AMH,经 *EcoR* I 和 *Hind* III 37 °C 双酶切后、凝胶纯化试剂盒纯化后将纯化产物与经相同酶酶切的载体 pGEX 相连接,连接产物转化大肠杆菌 JM109,提取质粒后再用上述酶进行双酶切,酶切结果(图 2)可见有大小约为 663 bp 的目的片段和 4 900 bp 的载体片段,表明目的片段已正确插入了表达载体从而成功的构建了表达质粒 pGEX-AMH。

### 2.4 融合蛋白的表达及鉴定

将重组质粒 pGEX-AMH 转化大肠杆菌 BL21 菌株后,以 0.3、1 mol/L IPTG 分别诱导 4 h,收集菌体,离心后加上样缓冲液煮沸破碎细

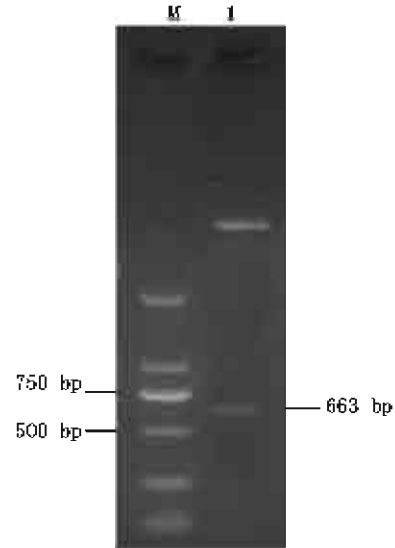


图2 重组质粒 pGEX-AMH 的限制性酶切分析  
M; DNA 分子量标记; 1; pMD18-T-AMH 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切。

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of pMD18-T-AMH plasmid

M; DNA molecular markers; 1; pMD18-T-AMH digested with *EcoR* I and *Hind* III.

胞,进行 12% 浓度的 SDS-PAGE 电泳(图 3)。由图 3 可知,加入 IPTG 诱导后,转入重组质粒的细菌总蛋白提取物中出现了大量分子量约为 49 ku 的表达蛋白(图 3 泳道 2 所示)。由于 pGEX 表达质粒本身可编码 26 ku 的 GST,而 AMH 分子量约为 23 ku,理论上融合蛋白的分子量约为 49 ku。这与预期结果相一致,重组表达载体经 IPTG 诱导后,融合蛋白得到表达。目的蛋白表达量经 BandScan 生物软件分析,约达到了细菌表达蛋白总量的 38.7%。Western-blotting 免疫印迹表明(图 4),重组菌所表达的融合蛋白可以特异性的被 anti-GST 抗体识别,即此蛋白具有 GST 抗原性,融合蛋白特异条带分子量大约为 49 ku,验证了此条带携带有 AMH 片段,同时证明了 AMH 融合蛋白在大肠杆菌中获得了表达。

### 2.5 表达蛋白的酶切与纯化

表达融合蛋白的细菌液经溶菌酶裂解后收集上清,过平衡好的 GSTrap FF column 层析柱,用洗脱缓冲液进行洗脱后收集洗脱液,经 SDS-PAGE 电泳检测,纯化蛋白为单一条带(图 3 泳道 4),分子量为 49 ku 左右。取纯化好的蛋白经 Factor Xa 酶切 4 h 后,经 GSTrap FF column 过柱

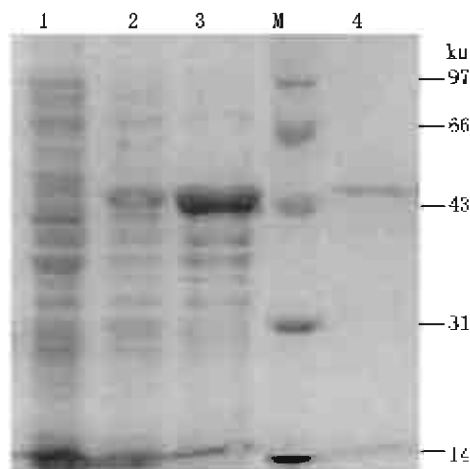


图3 鉴定大肠杆菌中AMH/GAP融合蛋白的  
SDS-PAGE分析

M: 蛋白质分子量标记; 1: *E. coli* BL21 经 1 mol/L IPTG 诱导 4 h; 2: 未诱导的 *E. coli* BL21/pGEX-AMH; 3: BL21/pGEX-AMH 经 1 mol/L IPTG 诱导 4 h; 4: 过柱纯化后的 AMH 蛋白。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed AMH/GAP fusion protein in *E. coli* BL21

M: protein molecular marker; 1: lysis supernatant of *E. coli* BL21 induced of IPTG; 2: lysis supernatant of *E. coli* BL21/pGEX-AMH without induction of IPTG; 3: lysis supernatant of *E. coli* BL21/pGEX-AMH induced of IPTG; 4: purified AMH protein.

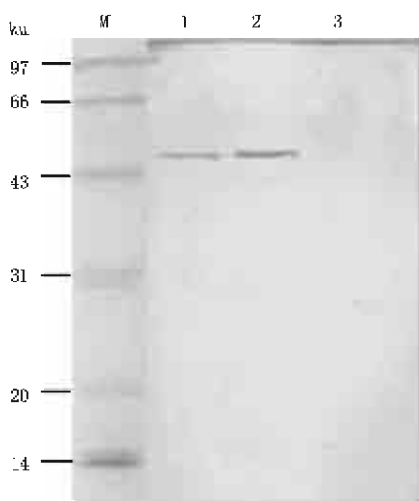


图4 蛋白免疫印迹

M: 蛋白质分子量标记; 1: 纯化后的 AMH 融合蛋白; 2: 未纯化 AMH 融合蛋白; 3: 未诱导的 pGEX-AMH 转化菌裂解物。

Fig. 4 Western-blotting analysis of expression of pGEX-5x-1 and pGEX-AMH

M: protein molecular marker; 1: purified AMH fusion protein; 2: purified AMH fusion protein; 3: Lysis supernatant of pGEX-AMH.

后,获得纯化后的 AMH 蛋白。SDS-PAGE 电泳检测结果表明,获得的蛋白为只有一条条带(图 5 泳道 2)即分子量为 23 ku 的为 AMH 蛋白。

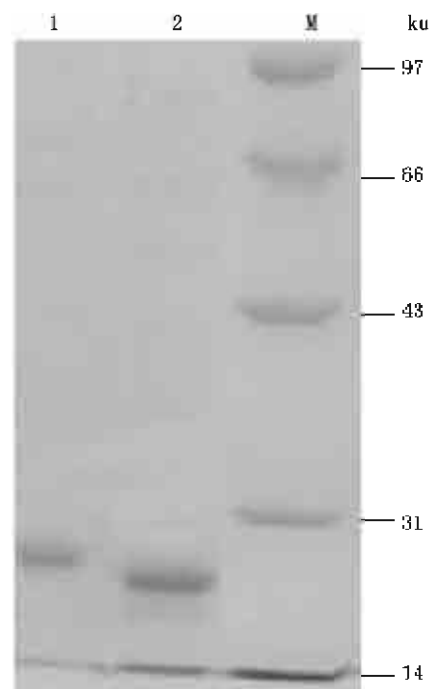


图5 AMH 融合蛋白的 Factor Xa 酶切

M: 蛋白质分子量标记; 1: GST 标准蛋白; 2: 纯化的 AMH 蛋白。

Fig. 5 Cleavage of purified AMH fusion protein by enterokinase

M: protein molecular marker; 1: GST protein; 2: purified AMH protein.

## 2.6 对小鼠免疫原性试验结果

初免 1 周后,免疫组小鼠的血清中就能检测到重组蛋白诱导产生的特异抗体,在加强免疫后第 5 周抗体滴度为  $0.672 \pm 0.411$ ,达到峰值(图 6),而空白对照组不能产生特异抗体,且免疫组与空白组抗体效价值差异显著( $P < 0.05$ )。对采集的血清检测其效价为 1:2 000,表明本实验纯化的 AMH 蛋白作为免疫原免疫小鼠,能够产生特异性抗体且具有相对较高的效价,可用以进一步研究 AMH 基因在罗非鱼性腺发育中的作用。

## 3 讨论

自 AMH 基因从人类上发现以来,该基因在哺乳动物上已经进行了广泛的研究,对其作用和功能都有较深入的报道,但其在硬骨鱼类研究却很少<sup>[24]</sup>。AMH 属于  $\beta$ -转化生长因子(TGF- $\beta$ )家族,分子量为 140 ku 的糖蛋白,具有调节细胞发育及分化,并使雄性胚胎苗勒氏管退化的作用。目前鱼类 AMH 基因的研究主要集中在基因

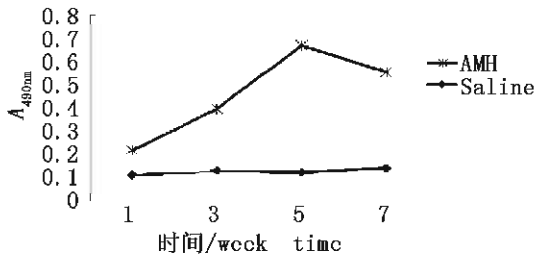


图6 小鼠免疫 AMH 和生理盐水后的抗体滴度分布  
采用 AMH 和生理盐水免疫后, AMH 组能产生特异性抗, 抗体滴度在第 5 周达到峰值, 生理盐水组不能产生特异性抗体。

Fig. 6 The titers of mice serum immunized with AMH protein and saline

After being immunized with AMH and saline as control, the AMH group induced special antibody and reached the peak at 5th week, but the Saline group didn't induce special antibody.

克隆及在各组织中的时空表达分析上<sup>[11]</sup>, 但对其蛋白质的构造和功能却很少有研究。哺乳类动物的 AMH 蛋白通常都是采用体外培养睾丸组织再通过色谱纯化的方法获得的<sup>[15-17]</sup>, 这种方法虽然能获得 AMH 蛋白, 但是程序复杂、获得的蛋白纯度不高, 因此我们采用分子生物学的方法, 在前期成功克隆到 AMH 基因的基础上通过分析其抗原性, 截取一部分序列进行原核表达, 从而制备 AMH 蛋白的多克隆抗体, 为进一步检测 AMH 蛋白在罗非鱼性腺内的表达模型、了解其调控性腺发育打下了基础。

在本实验中, 我们采用 GSTrap FF column 小柱子纯化蛋白, 获得了较好的效果, 取得的蛋白质纯度也较高。当然原核表达也有其局限性, 主要表现在以下几个方面: 没有转录后糖基化、甲基化等修饰, 这也是很多真核基因在原核系统里不能表达或者表达后没有活性的原因; 其次是不同的表达系统有其表达密码子的偏爱性, 这也是导致许多基因在原核系统中不能表达的原因之一; 大约 50% 的基因在原核系统中表达为包涵体, 导致蛋白的后纯化效率和步骤较为复杂。

本试验通过对前期试验中获得的 AMH 序列进行分析, 选择其抗原性较强的 22 ~ 243 位的氨基酸相对应的 cDNA 序列作为模板, 设计特异引物, 采用 RT-PCR 方法成功的从罗非鱼卵巢中克隆到长约 663 bp 的序列, 对该片段进行克隆测序, 并将其克隆到 pGEX-5X-1 表达载体中, 通过 IPTG 诱导, GSTrapFF 柱的纯化, 获得了较纯的具有免疫活性的重组蛋白, 采用 Factor Xa 蛋

白酶切、进一步纯化后, 获得了可作为免疫原的 AMH 表达蛋白。

#### 参考文献:

- [1] Rey R, Picard J R. Embryology and endocrinology of genital development, Baillière's Clinical [J]. Endocrinology and Metabolism, 1998, 12(1): 17 - 33.
- [2] Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, et al. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(10): 3836 - 3844.
- [3] Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation [J]. Development, 1991, 113: 613 - 624.
- [4] Trbovich A M. Mullerian inhibiting substance lowers testosterone in luteinizing hormone-stimulated rodents [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(6): 3393 - 3397.
- [5] Durlinger A L L. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 2001, 142(1): 4891 - 4899.
- [6] Durlinger A L L. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 2002, 143(3): 1076 - 1084.
- [7] Vigier B. Anti-Mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(10): 3684 - 3688.
- [8] Di Clemente N. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries [J]. Endocrine, 1994, 2(6): 553 - 558.
- [9] Miura T, Miura C, Konda Y, et al. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel [J]. Development, 2002, 129: 2689 - 2697.
- [10] Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, et al. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(2): 508 - 513.
- [11] Rodríguez-Marí A, Yan Y L, Bremiller R A, et al.

- Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (AMH) relative to *Sox9a*, *Sox9b*, and *CYP19a1a*, during gonad development [J]. *Gene Exp Patterns*, 2005, 5(5), 655-664.
- [12] 唐永凯, 李建林, 俞菊华. 奥利亚罗非鱼 AMH 基因结构及其表达[J]. *水产学报*, 2009, 33(3): 379-388.
- [13] 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等(译). 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Halm S, Rocha A, Miurb T, *et al.* Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms [J]. *Gene*, 2007, 388(1-2): 148-158.
- [15] Josso N, Picard J Y, Vigier B. Purification of bovine antimullerian hormone using a monoclonal antibody [C]//Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1981, 293(8): 447-450.
- [16] Picard J Y, Goulu C, Bourrillon R, *et al.* Biochemical analysis of bovine testicular anti-Mfillerian hormone [J]. *FEBS letter*, 1986, 195, (1-2): 73-76.
- [17] 姚翠鸾, 冀培丰, 孔鹏, 等. 凡纳滨对虾精氨酸酶的多克隆抗体制备及组织特异性表达分析[J]. *水产学报*, 2009, 33(6): 1026-1030.

## Cloning and expression of anti-mullerian hormone partial gene and preparation of polyclonal antibody

DING Wei-dong, CAO Zhe-ming, CAO Li-ping \*

(Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Anti-mullerian hormone (AMH), (also called mullerian-inhibiting substance, MIS), a member of the transforming growth factor- $\beta$  family (TGF- $\beta$ ), is a peptide growth factor, which is the regression of the Müllerian duct in the male foetus during early testis differentiation. To study the function of the AMH protein and the distribution of AMH in differentiating tilapia testis and ovary, the partial AMH cDNA was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and expressed in *E. coli* and polyclonal antibody was prepared for the further study. The antigenicity of AMH was first predicted by using DNASTAR software in which the 22–243 amino acids have strong antigenicity and immunogenicity. At the same time, the special primers were designed by PRIMER 5.0 and the cDNA encoding AMH was amplified from total RNA of *O. aurea* gonad by RT-PCR, and blasted against other AMH cDNA sequences in the GenBank. The analysis of the sequence data indicated that the coding region of the cDNA fragment, which encoded 221 amino acid residues, was about 663 bp in size. The amplified cDNA fragment was cloned into the prokaryotic expression vector, pGEX-5x-1, to produce the expression vector pGEX-AMH. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21. AMH-GST fusion protein was obtained after the addition of IPTG into the growth media. SDS-PAGE analysis revealed that the AMH-GST was expressed after induction with IPTG for 4h. A protein band of 49 ku appeared on SDS-PAGE gel and was proved by Western blot. The mass production of the recombinant protein was about 38.7% of total bacteria protein. After purification and cleavage of the fusion protein, purified AMH protein could be obtained. Then the fusion protein was used to immunise some ICR mice to produce anti-AMH antibody. This fusion protein could significantly elicit specific antibody response in immunized mice compared with the blank groups, and the peak of serum reached  $0.672 \pm 0.411$  at the 5th week after immunization. These results demonstrated that recombinant protein could induce high AMH antibody responses in laboratory animals. In this study, we report the expression of partial AMH gene and preparation of polyclonal antibody of recombinant AMH protein. For nearly two decades, research on AMH had been focused almost exclusively on mammals and birds. There were no reports of an AMH orthologue in teleost fish, and there might even have been some doubts about its existence given the name of this hormone and the fact that modern teleost do not have Müllerian ducts. Our study first reports that an AMH exists in tilapia and the polyclonal antibody was raised. In present study, the GSTrap FF column was used to purify the recombinant protein and the high purity AMH protein was obtained. Prokaryotic recombinant protein expression systems have several advantages. These include ease of culture, and very rapid cell growth. Expression can be induced easily in bacterial protein expression systems using IPTG. Also, purification is quite simple in prokaryotic expression systems and there are a lot of commercial kits available for recombinant protein expression. In conclusion, our results showed that partial AMH gene was cloned and polyclonal antibody was prepared for further research.

**Key words:** *Oreochromis aurea*; anti-mullerian hormone; prokaryotic expression; antibody; immunogenicity

**Corresponding author:** CAO Li-ping. E-mail: caolp@ffrc.cn