

研究论文

大黄鱼肌肉生长抑制素-1前肽原核表达、多克隆抗体制备和功能验证

应 俊 薛良义*

(宁波大学海洋学院, 宁波 315211)

摘要 肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)在动物肌肉的生长和发育过程中起着重要作用。该研究通过RT-PCR从大黄鱼(*Larimichthys crocea*)肌肉组织中克隆肌肉生长抑制素-1前肽基因(MSTN-1pros), 构建了表达大黄鱼生长抑制素前肽的重组质粒, 并在大肠杆菌BL21(DE3)中进行表达, 获得了大黄鱼MSTN-1pros融合蛋白。用分离的重组蛋白免疫大白兔, 制备了抗大黄鱼MSTN-1pros的多克隆抗体。经蛋白免疫印迹法检测, 确定获得的抗体具有较高的特异性。通过对大黄鱼幼鱼的注射实验, 发现注射过MSTN-1pros抗体的大黄鱼增重率比对照组降低了20.71% ($P < 0.05$), 证明MSTN前肽抗体对大黄鱼的生长具有抑制作用。实验结果表明, MSTN前肽蛋白可以用于养殖鱼类的生长调控。

关键词 肌肉生长抑制素前肽; 大黄鱼; 原核表达; 多克隆抗体; 肌肉生长

Large Yellow Croaker MSTN-1 Prodomain Prokaryotic Expression, Polyclonal Antibody Preparation and Antibody Function Identification

Ying Jun, Xue Liangyi*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Myostatin (MSTN) plays an important role in the muscle growth and development of animals. MSTN-1 prodomain (MSTN-1pros) gene was cloned from the muscle tissue of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) by RT-PCR. Recombinant expression vectors containing large yellow croaker MSTN-1pros were constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant fusion protein was induced with IPTG and isolated by SDS-PAGE. The isolated fusion protein was used to raise the polyclonal antibody of MSTN-1pros by immunizing rabbit. The result of Western blot showed that the polyclonal antibody was highly specific. The weight gain rate of the juvenile large yellow croaker injected with MSTN-1pros antibody was 20.71% lower than that of the control group ($P < 0.05$). The results indicated that MSTN-1pros antibody had a biological function of inhibiting the muscle growth of large yellow croaker. It implied that recombinant MSTN-1pros could be employed in aquaculture to improve fish growth.

Key words MSTN-1 prodomain; large yellow croaker; prokaryotic expression; polyclonal antibody; muscle growth

收稿日期: 2014-04-08 接收日期: 2014-06-16

国家自然科学基金(批准号: 30871916)、浙江省科技厅项目(批准号: 2011C22087)和宁波市科技局项目(批准号: 2011C10001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87600165, E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn

Received: April 8, 2014 Accepted: June 16, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30871916), the Project from Science and Technology Department of Zhejiang Province (Grant No.2011C22087) and the Project of Ningbo Municipality (Grant No.2011C10001)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87600165, E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn

网络出版时间: 2014-09-26 14:23 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0115.html>

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN), 即生长分化因子-8(growth differentiation factor-8, GDF-8), 是转化生长因子 β 超家族(transforming growth factor- β super-family, TGF- β)的成员^[1]。MSTN对肌肉的生长具有抑制作用, 该基因敲除的小鼠与野生型相比, 肌肉增长了2~3倍^[1]; 布卢牛和皮埃蒙特牛MSTN基因自然突变失活, 它们的肌肉量比正常牛提高了约20%^[2-3]。在鱼类中, 斑马鱼的MSTN基因活性被抑制后, 肌肉变得肥大, 生长速度明显提高^[4]。注射MSTN dsRNA到发育早期的斑马鱼胚胎, 斑马鱼体型也会变大^[5]。

MSTN基因指导MSTN前体蛋白的合成, 其序列包括信号肽、N-端前肽区、RXXR蛋白酶水解位点和C-端TGF- β 成熟肽结构域, 其中最保守的区域为TGF- β 成熟肽结构域, 含有9个保守的半胱氨酸位点^[6]。MSTN前体蛋白需要经过两次剪切, 第一次由蛋白酶切除N-端的信号肽; 第二次在RXXR(Arg-Ser-Arg-Arg)结构处切割, 产生前肽蛋白(MSTN-1pros)和成熟肽蛋白^[6-7]。在动物体内, 成熟肽蛋白形成二聚体, 前肽蛋白能和二聚体成熟肽蛋白结合^[8], 从而起到抑制成熟肽功能的作用^[9-10]。因而, 前肽蛋白能促进骨骼肌生长, 如转了MSTN前肽基因的斑马鱼其骨骼肌纤维的数目明显增多^[11]。转入MSTN前肽基因的小鼠, 肌肉量大幅度增加, 增加程度与MSTN基因敲除的小鼠相当^[9]。利用腺病毒将MSTN前肽基因转到营养不良的小鼠和狗体内, 他们的肌肉都得到了增加^[12-14]。

近年来, 人们开始探讨利用MSTN前肽来调控经济动物的生长, 如利用大肠杆菌表达牙鲆MSTN前肽, 并用该重组蛋白浸泡虹鳟幼鱼, 使浸泡组虹鳟体重比对照组提高42%^[15]。体外重组表达的乌鲷鱼和金鲷的MSTN前肽, 经纯化后, 能与MSTN成熟肽结合, 从而抑制MSTN成熟肽蛋白的活性^[16]。

大黄鱼属于鲈形目石首鱼科, 个体大、肉质鲜美而且营养价值很高, 是一种经济价值较高的海洋鱼类, 也是中国重要的海水养殖鱼类。由于多年养殖后, 出现了生长速度减慢、性成熟个体体型变小等经济性性状退化现象, 因此提高其生长速度是养殖业者普遍关心的一个问题。本实验室构建的转大黄鱼MSTN-1前肽基因的红鲤, 其孵化后75 d与对照组相比, 体长和体重分别提高了21.31%和27.59%^[17], 说明大黄鱼MSTN前肽基因具有较强的促进肌肉生长的功能。本研究通过在体外表达大黄鱼MSTN-1pros重组蛋白,

并制备多克隆抗体及进行功能验证, 为在水产养殖业中利用大黄鱼MSTN-1pros重组蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大黄鱼采自浙江象山宁波海湾水产苗种繁育中心, 取肌肉组织, 置于液氮中, 然后在-80 °C冰箱保存。E. coli DH5 α 、BL21(DE3)及载体pET-28a(+), 均由本实验室保存。Trizol、UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒EZ-10 spin column plasmid mini-preps Kit购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 逆转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、pMD18-T Vector试剂盒、BamH I限制性内切酶、Hind III限制性内切酶和T₄ DNA连接酶购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 大黄鱼MSTN-1前肽区基因的扩增

根据本实验室克隆到的大黄鱼MSTN-1基因序列(AY842933)设计引物, 上游引物为W1-BamH I: 5'-CGG GAT CCG ACC AAG AGA CGC ACC AG-3'; 下游引物为W2-Hind III: 5'-CCA AGC TTC ACC TCC TAG AAC GGT T-3'。上、下游引物分别含有BamH I、Hind III内酶切识别位点, 扩增的目的片段大小为718 bp(其中, 702 bp为MSTN-1前肽基因的序列, 其余16 bp为酶切位点及保护碱基)。

用Trizol抽提大黄鱼肌肉组织总RNA, 使用反转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit)反转录获得cDNA。以cDNA为模板, 使用W1-BamH I和W2-Hind III引物扩增目的片段。PCR条件: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 循环30次; 72 °C延伸6 min。

扩增获得的片段经纯化后连接到pMD-18T Vector上。将连接好的质粒经热激转化到感受态的大肠杆菌DH5 α 细胞中, 利用蓝白斑筛选、PCR检测和测序确定阳性克隆质粒pMD-18T-MSTN-1pros。阳性质粒pMD-18T-MSTN-1pros和表达质粒pET-28a(+)分别用BamH I和Hind III内切酶双酶切, 回收片段MSTN前肽, 并与酶切后的载体pET-28a(+)连接, 转化到大肠杆菌DH5 α 细胞中。利用BamH I和Hind III对它们分别进行双酶切反应和测序鉴定得到阳性克隆。

1.3 大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白的表达

将阳性表达质粒pET-28a(+)-MSTN-1pros转化到宿主大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中, 挑取阳

性克隆菌在含卡那霉素(30 $\mu\text{g/mL}$)的LB液体培养基中过夜振荡培养, 过夜培养的菌液按1:50的比例接种到上述液体培养基中扩大培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养约3~4 h后, 加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)并使其终浓度为1 mmol/L, 诱导外源基因表达, 继续培养诱导0, 2, 3, 4, 5 h。收集菌液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min离心5 min, 收集菌体, 加入PBS缓冲液悬浮, 室温12 000 r/min离心10 min, 将沉淀组分溶解于5 $\times$ 蛋白上样缓冲液中, 煮沸10 min裂解, 用于SDS-PAGE检测。确定好最佳诱导时间后, 按照最佳诱导时间大量诱导细菌表达重组蛋白。

1.4 大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白多克隆抗体的制备和纯化

将电泳后的凝胶置于0.25 mmol/L KCl溶液中染色, 2~3 min后出现乳白色的目的条带, 割下目的条带, 用PBS缓冲液洗去残留的KCl溶液, 洗2次, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。免疫前用研钵充分研磨胶条, 用PBS缓冲液进行4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜回收, 回收得到的即为初步纯化的前肽。前肽溶液与等体积的弗氏佐剂(第一次免疫使用弗氏完全佐剂, 之后用弗氏不完全佐剂)震荡混匀, 免疫新西兰大耳白兔, 初次免疫抗原用量500 μg /只; 每10 d进行一次加强免疫, 一共3次, 每次抗原用量100 μg /只。末次免疫后第10 d取血。

取得的血液37 $^{\circ}\text{C}$ 放置20 min, 然后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。4 000 r/min离心10 min, 取上清。在血清中加入一定量的空白BL21(DE3)菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放2 h, 10 000 r/min离心7 min, 取上清液。参考岳喜庆等^[18]的方法, 用饱和硫酸铵盐析法提纯抗体。用紫外分光光度计检测浓度后, 置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.5 大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白Western blot检测

按照Western blot试剂盒进行免疫印迹, 检测目的蛋白。用湿法将蛋白从变性胶转移到PVDF(polyvinylidene fluoride)膜, 封闭液封闭, 一抗与封闭液的比例1:1 000, 二抗与封闭液的比例为1:10 000。

1.6 大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白的功能验证

体重为11.53 $\pm$ 0.19 g的养殖大黄鱼60尾, 随机分成实验组30尾和对照组30尾, 实验组腹腔注射大黄鱼MSTN-1pros抗体溶液, 注射两次, 注射量为50 μg /尾抗体, 对照组注射等量生理盐水, 10 d后再注射1次。整个实验期间均采用饱食投喂, 水温22.5~27.5 $^{\circ}\text{C}$, 盐度27‰~31‰, 溶解氧含量在6 mg/L以上, 养殖1个月。实

验结束时, 养殖鱼饥饿24 h, 丁香酚(1:10 000)麻醉, 称重, 按下列公式计算增重率: 增重率(%)=100 $\times$ (Wt-Wo)/Wo, 其中Wo为实验开始时的体质量, Wt为实验结束时的体质量。数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 实验数据用One-way ANOVA分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MSTN-1前肽的基因克隆和重组载体的鉴定

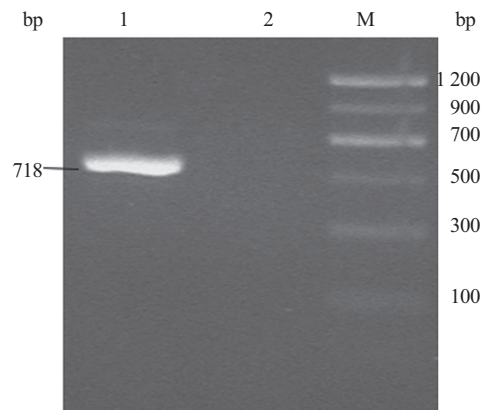
通过RT-PCR, 扩增到大小为700 bp左右的明亮条带(图1)。PCR产物连接到克隆质粒pMD-18T和表达质粒pET-28a(+), 构建的重组克隆质粒pMD-18T-MSTN-1pros和表达质粒pET-28a(+)-MSTN-1pros(图2)经双酶切和测序验证, 插入的片段正确。

2.2 MSTN-1前肽融合蛋白的诱导表达及鉴定

将重组质粒pET-28a(+)-MSTN-1pros转化到大肠杆菌BL21(DE3), 用1 mmol/L IPTG诱导3 h后, 离心收集菌体, 15% SDS-PAGE电泳检测。结果表明, 经诱导后含有质粒pET-28a(+)-MSTN-1pros的菌株大量表达的重组蛋白, 主要以不溶形式存在。蛋白大小与预期的分子量一致, 约为31 kDa(图3)。在诱导菌蛋白提取液的上清部分, 目的蛋白的条带不明显, 可见表达的重组蛋白主要是以包涵体形式存在的。大肠杆菌在相同条件下, 诱导0, 2, 3, 4, 5 h后分别检测, 结果表明诱导3 h获得的重组蛋白最多(图4)。

2.3 Western blot检测

Western blot结果显示, 在诱导菌蛋白提取液中

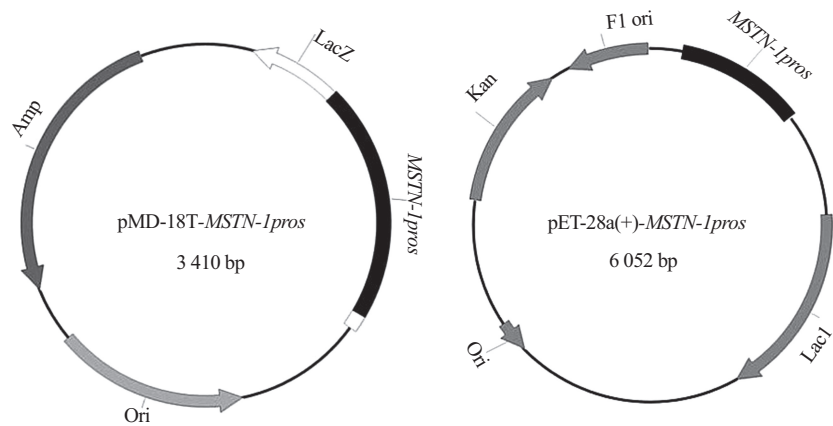


M: DNA marker; 1: MSTN-1前肽的PCR产物(718 bp); 2: 空白对照(模板为重蒸水)。

M: DNA marker; 1: PCR product of MSTN-1pros (718 bp); 2: blank (ddH₂O for template).

图1 MSTN-1前肽基因RT-PCR产物电泳图

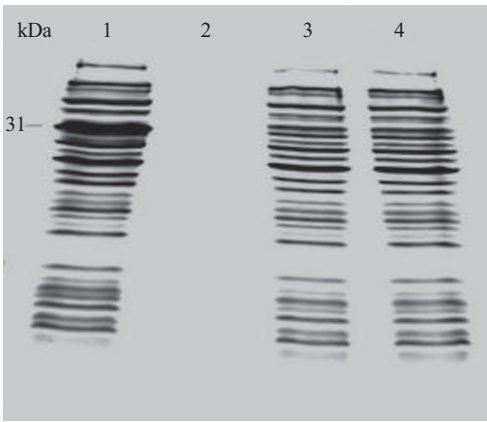
Fig.1 Electrophoretic analysis of RT-PCR product of MSTN-1pros



重组克隆质粒pMD-18T-MSTN-Ipros(左); 重组表达质粒pET-28a(+)-MSTN-Ipros(右)。
Recombinant cloning vector pMD-18T-MSTN-Ipros (left); recombinant expression vector pET-28a(+)-MSTN-Ipros (right).

图2 质粒构建示意图

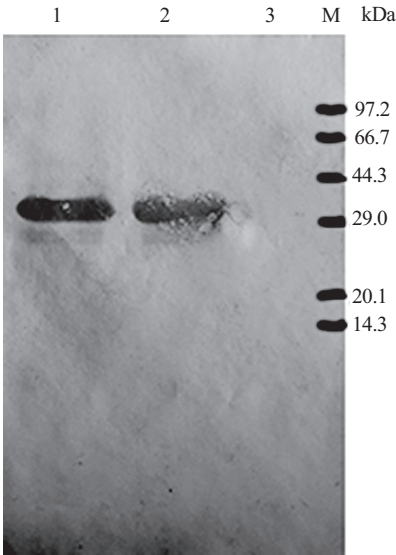
Fig.2 Schematic structure of recombinant vectors



1: 诱导菌的总蛋白; 2: 诱导菌的的上清液; 3: BL21菌蛋白空白对照;
4: 含空质粒pET-28a(+)-BL21菌蛋白空白对照。
1: total fraction; 2: soluble fraction; 3: total fraction of uninduced BL21 (DE3); 4: total fraction of BL21 (DE3) transformed pET-28a(+) vector.

图3 原核表达的重组蛋白SDS-PAGE分析

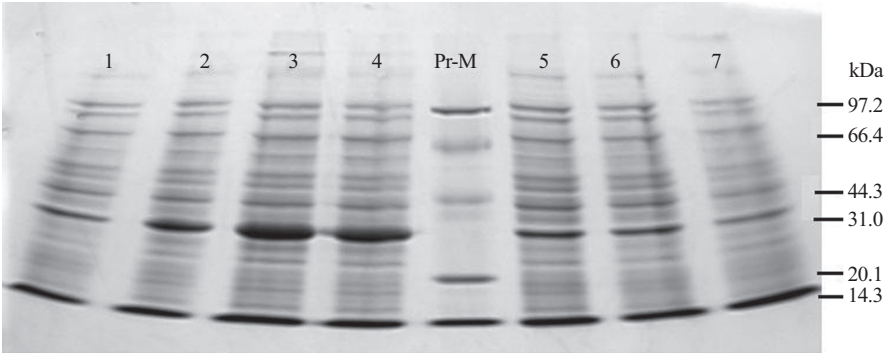
Fig.3 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expressed recombinant proteins



1~2: MSTN-1前肽; 3: 空白对照; M: marker。
1~2: MSTN-1pros; 3: control group; M: marker.

图5 重组蛋白的Western blot分析

Fig.5 Recombinant proteins analyzed by Western blot



1~5: 分别为诱导0, 2, 3, 4, 5 h的细菌蛋白; 6: BL21空白菌蛋白; 7: 含pET-28a(+)空质粒的BL21(DE3)菌蛋白; Pr-M: marker。
1~5: total fraction after induction of 0, 2, 3, 4, 5 h, respectively; 6: total fraction of BL21 (DE3); 7: total fraction of BL21 (DE3) transformed pET-28a(+) vector; Pr-M: marker.

图4 诱导时间对重组蛋白表达量的影响

Fig.4 Effect of different induction time on the mass of the recombinant proteins

有一条明亮的目标条带出现在30 kDa附近, 蛋白大小约为31 kDa, 符合预期蛋白大小。结果也表明, 该多克隆抗体具有较高的特异性(图5)。

2.4 大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白抗体的功能验证

注射MSTN-1pros多克隆抗体后的大黄鱼, 经一个月养殖, 对照组与实验组幼鱼的成活率分别为88.89%和83.33%, 两组间差异不显著($P>0.05$)。对照组实验开始时的初始体质量为 11.48 ± 0.18 g, 实验结束时终体质量为 22.72 ± 0.94 g, 增重率为97.91%; 实验组的体质量从 11.58 ± 0.20 g增加到 22.72 ± 0.90 g, 增重率为77.20%。对照组的增重率比实验组高了20.71%, 差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

在大肠杆菌中表达外源重组蛋白时, 由于重组蛋白的错误折叠, 使得重组蛋白往往以不溶于水的包涵体形式存在, 且没有生物学活性^[19]。主要原因有以下两个方面^[20-22]: (1)外源重组蛋白合成过多、过快, 蛋白没有足够的时间用来折叠, 二硫键不正确配对; (2)宿主细胞内环境, 包括还原性环境无法使蛋白的二硫键正确配对, 温度较高, pH接近蛋白质等电点, 缺乏折叠辅助因子。如果要使包涵体形式存在的重组蛋白具有生物学活性, 需要进行相关化学处理, 如尿素、盐酸胍、DTT、 β -巯基乙醇^[23-24]。但包涵体可以用来制备多克隆抗体, 已有研究报道使用包涵体制备了多克隆抗体^[25-26]。在本研究中, 利用大肠杆菌表达了大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白, 获得的重组蛋白也是以包涵体形式存在于细胞中。Western blot结果表明, 制备的多克隆抗体具有较好特异性。

鱼类生长的调控存在正调控和负调控, 重要的正调控因子有生长激素^[27]、MSTN-1前肽^[15]、Follistatin^[28]和ActRIIB^[29]等; 重要的负调控因子有MSTN^[4-5,30]。除了生长激素外, 调节与MSTN-1通路相关的基因或蛋白也是一条重要的途径。由于人们对转基因比较敏感, 而在蛋白质水平上调控养殖鱼类的生长, 可以避免敏感的转基因食物, 以及转基因造成的一些潜在危害, 因此有些研究者开始从重组蛋白着手。给金鱼幼鱼注射能与MSTN-1相结合的ActRIIB重组蛋白^[9], 能明显提高金鱼幼鱼的生长速度, 养35 d后测体重, 实验组鱼的体重比对照组的重39%^[29]。Acosta等^[27]报道重组生长激素可促进罗非

鱼幼鱼的生长, 并提高先天性免疫能力。可见, 无论是通过抑制MSTN-1的功能, 如利用MSTN-1前肽和Follistatin^[28], 还是提高体内生长激素的含量, 都能促进鱼类的生长。

为了能使表达的重组蛋白不需进行变性、复性等处理而具有生物学活性, 从而方便生产应用。Lee等^[15]用了3种表达质粒pET32a、pET43.1a和pMALc2X与5种大肠杆菌菌株BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS、Origami2(DE3)、Origami2(DE3)pLysS和Rosetta-gami2(DE3)pLysS互相组合, 结果发现, 只有pMALc2X和Rosetta-gami2(DE3)pLysS组合具有较好的效果, 能够产生可溶性的重组蛋白, 且表达效果与温度有关, 在12.5 °C时只表达可溶性重组蛋白, 而在25 °C和37 °C时同时表达可溶性和不溶性的重组蛋白。用获得的可溶性牙鲈MSTN-1前肽重组蛋白浸泡虹鳟幼鱼, 实验组虹鳟体重明显高于对照组, 且具有剂量效应, 证明可溶性重组蛋白具有生物学活性。这一研究结果为表达可溶性重组蛋白及其生产性应用提供了一条途径。

在本研究中, 由于我们获得的大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白是包涵体, 不具有生物学活性, 但用MSTN-1前肽重组蛋白的抗体注射大黄鱼幼鱼, 能够抑制大黄鱼幼鱼的生长, 也间接证明了大黄鱼MSTN-1前肽对大黄鱼幼鱼生长的促进作用。为今后表达可溶性大黄鱼MSTN-1前肽重组蛋白及在大黄鱼养殖生产中利用MSTN-1重组蛋白打下了基础。

参考文献 (References)

- Mcpherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 1997; 387(6628): 83-90.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(23): 12457-61.
- Kambadur R, Sharma M, Simth TP, Bass JJ. Mutations in *myostatin* (GDF8) in double-muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 1997; 7(9): 910-6.
- Fuentes EN, Pino K, Navarro C, Delgado I, Valdés JA, Molina A. Transient inactivation of *myostatin* induces muscle hypertrophy and overcompensatory growth in zebrafish via inactivation of the SMAD signaling pathway. *J Biotechnol* 2013; 168(4): 295-302.
- Acosta J, Carpio Y, Borroto I, González O, Estrada MP. *Myostatin* gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol* 2005; 119(4): 324-331.
- Rodgers BD, Weber GM. Sequence conservation among fish *myostatin* orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*.

- Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2001; 129(2/3): 597-603.
- 7 Lee SJ. Regulation of muscle mass by *myostatin*. Annu Rev Cell Dev Biol 2004; 20(1): 61-86.
- 8 Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL. *Myostatin* signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. Cytokine 2004; 26(6): 262-72.
- 9 Lee SJ, McPherron AC. Regulation of *myostatin* activity and muscle growth. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(16): 9306-11.
- 10 Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NW, *et al.* The *Myostatin propeptide* and the *follistatin*-related gene are inhibitory binding proteins of *myostatin* in normal Serum. J Biol Chem 2002; 277(43): 40735-41.
- 11 Xu C, Wu G, Zohar Y, Du SJ. Analysis of *myostatin* gene structure, expression and function in zebrafish. J Exp Biol 2003; 206(Pt 22): 4067-79.
- 12 Bartoli M, Poupiot J, Vulin A, Fougereousse F, Arandel L, Daniele N, *et al.* AAV-mediated delivery of a mutated *Myostatin propeptide* ameliorates calpain 3 but not α -sarcoglycan deficiency. Gene Ther 2007; 14(9): 733-40.
- 13 Qiao CP, Li JB, Jiang JG, Zhu XD, Wang B, Li J, *et al.* *Myostatin propeptide* gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in *mdx* mice. Hum Gene Ther 2008; 19(3): 241-53.
- 14 Qiao CP, Li J, Zheng H, Bogan J, Li JB, Yuan ZH, *et al.* Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus 8 carrying canine *Myostatin propeptide* gene in normal dogs enhances muscle growth. Hum Gene Ther 2009; 20(1): 1-10.
- 15 Lee SB, Kim YS, Oh MY, Jeong IH, Seong KB, Jin HJ. Improving rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth by treatment with a fish (*Paralichthys olivaceus*) *myostatin* prodomain expressed in soluble forms in *E. coli*. Aquaculture 2010; 302(2/3): 270-8.
- 16 Rebhan Y, Funkenstein B. Inhibition of fish *myostatin* activity by recombinant fish *follistatin* and *myostatin* prodomain: Potential implications for enhancing muscle growth in farmed fish. Aquaculture 2008; 284(1/2/3/4): 231-8.
- 17 汤泽源, 薛良义, 胡铭炎. 利用不同基因转移方法构建转基因红鲤. 农业生物技术学报(Tang Zeyuan, Xue Liangyi, Hu Mingyan. Construction of transgenic red carp(*cyprinus carpio*) by different gene transfer methods. Journal of Agricultural Biotechnology) 2013; 21(1): 19-28.
- 18 岳喜庆, 冯巧萍, 张和平, 刘长江, 孟宪文. 牛血清免疫球蛋白的盐析法提取与纯化. 中国乳品工业(Yue Xiqing, Feng Qiaoping, Zhang Heping, Liu Changjiang, Meng Xianwen. Studies on extraction and purification methods of saltingout IgG from bovine serum. China Dairy Industry) 2005; 33(3): 16-21.
- 19 Kane JF, Hartley DL. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol 1988; 6(5): 95-101.
- 20 Villaverde A, Carrió MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies. Biotechnol Lett. 2003; 25(17): 1385-95.
- 21 Ventura S. Sequence determinants of protein aggregation: Tools to increase protein solubility. Microb Cell Fact 2005; 4(1): 11-8.
- 22 王 增, 马会勤, 张 文, 陈尚武. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展. 中国生物工程杂志(Ma Zeng, Ma Huiqin, Zhang Wen, Chen Shangwu. The progress of inclusion body isolation and chromatographic refolding, purification methods. China Biotechnology) 2009; 29(7): 102-7.
- 23 刘晓飞, 裴剑竹, 杜国俊, 杨章民. 蛇毒蛋白原核表达包涵体复性研究进展. 中国生物工程杂志(Liu Xiaofei, Pei Jianzhu, Du Guojun, Yang Zhangmin. Recent progress in renaturation of inclusion bodies of prokaryotically expressed snake venom proteins. China Biotechnology) 2011; 31(3): 113-9.
- 24 方 敏, 黄华梁. 包涵体蛋白体外复性的研究进展. 生物工程学报(Fang Min, Huang Hualiang. Advances *in vitro* refolding of inclusion body proteins. Chinese Journal of Biotechnology) 2001; 17(6): 608-12.
- 25 储 琳, 刘清云, 钱 旻, 严缘昌, 李逸平. 斑马鱼*cdk7*和*cyclin H*基因的原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定. 细胞生物学杂志(Chu Lin, Liu Qingyun, Qian Min, Yan Yuanchang, Li Yiping. Prokaryotic expression and polyclonal antibodies preparation of *cdk7* and *cyclin H* in zebrafish. Chinese Journal of Cell Biology) 2006; 28(6): 849-54.
- 26 许兰娇, 洪智敏, 司 微, 刘宝生, 张锦华, 刘思国, 等. 鸡 β -防御素-9的融合表达及其多克隆抗体的制备与鉴定. 动物营养学报(Xu Lanjiao, Hong Zhimin, Si Hui, Liu Baosheng, Zhang Jinhua, Liu Siguo, *et al.* Fusion expression of chicken β -defensin-9 and preparation, characterization of its polyclonal antibody. Chinese Journal of Animal Nutrition) 2013; 25(3): 603-8.
- 27 Acosta J, Carpio Y, Besada V, Morales R, Sánchez A, Curbelo Y, *et al.* Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis sp.*). Gen Comp Endocrinol 2008; 157(1): 49-57.
- 28 Medeiros EF, Phelps MP, Fuentes FD, Bradley TM. Over-expression of *follistatin* in trout stimulates increased muscling. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2009; 297(1): 235-42.
- 29 Carpio Y, Acosta J, Morales R, Santisteban Y, Sánchez A, Estrada MP. Regulation of body mass growth through activin type IIB receptor in teleost fish. Gen Comp Endocrinol 2009; 160(2): 158-67.
- 30 Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG. A mutation in the *myostatin* gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. PLoS Genet 2007; 3(5): 780-86.