

半滑舌鳎生长因子 *midkine* 的定点改造及原核表达

王亚楠^{1,2}, 刘旭东^{1,3}, 穆琳琳¹, 刘志鹏¹, 李春梅¹, 于海洋¹, 张全启^{1*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛市海洋与渔业局, 山东 青岛 266071;

3. 国家海洋局北海环境监测中心, 山东 青岛 266033)

摘要:为进一步研究半滑舌鳎 *midkine*(MK)成熟肽活性与功能,对半滑舌鳎生长因子 MK 成熟肽进行定点改造及原核表达。根据大肠杆菌偏爱密码子的特点,实验利用 SOEing PCR 法对半滑舌鳎 MK 成熟肽进行定点突变。将改造后的半滑舌鳎成熟肽 MK 克隆到载体质粒 pET32a(+),构建原核表达载体 pET32a(+)-MK,并转化至大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 菌株中。SDS-PAGE 结果显示,与对照组相比,经 IPTG 诱导表达后半滑舌鳎重组蛋白 MK 存在于大肠杆菌上清液中,产物相对分子质量约为 33 ku。研究表明,本实验对半滑舌鳎生长因子 *midkine* 成功进行了定点改造,原核表达质粒成功构建并在大肠杆菌中高效表达,且主要以可溶形式存在。

关键词:半滑舌鳎; *midkine*; 原核表达; 融合蛋白

中图分类号: Q 781; S 917.4

文献标志码: A

midkine(MK)是 1988 年由 Kadomatsu 等^[1]首先发现的一种新基因,是一类新的肝素结合性生长因子,与多效营养因子(pleiotrophin, PTN)基因结构和氨基酸组成非常类似,二者同属于 Midkine 家族。在小鼠和人中, MK 在胚胎发育时期广泛表达,出生后表达降低,而成体组织中仅在肾脏和多种癌细胞中高表达,如肿瘤、乳腺癌、肝癌、结肠癌、胰腺癌等^[1-7]。然而,在斑马鱼(*Danio rerio*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中存在两种 MK(mka 和 mkb),不同于哺乳动物在胚胎发育早期的广泛表达,斑马鱼 mka 和 mkb 的表达具有空间特异性,二者在胚胎发育时期和成鱼大脑中表达分布均不同,显示出哺乳动物与鱼类的 MK 在功能上可能存在着差异^[8]。

近年来的研究表明, MK 具有多种生物学功能,它能促进正常细胞生长和分化,尤其是神经细胞的发育^[3],它可以延长中心神经元的生长期并促进轴突的外生等^[9]。另外, MK 参与肿瘤细胞的增殖、存活及转移过程。MK 的反义寡脱氧核糖核酸能有效地抑制小鼠结肠癌细胞的生

长^[10],在癌细胞中阻断其受体也可以限制肿瘤的生长和转移,这些研究反向证实了 MK 具有肿瘤生长因子作用。近年来, MK 已经成为恶性肿瘤在内的多种疾病治疗中颇具前景的分子靶点,可用于恶性肿瘤的临床诊断、治疗评价以及抗肿瘤新药的开发。基于它的应用前景, MK 的蛋白表达及临床研究也因此成为国内外学者关注的焦点之一^[11-13]。

鱼类中,斑马鱼、虹鳟、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)等多个物种的 MK 已被克隆并进行了初步的功能研究。在斑马鱼胚胎发育过程中, mdka 在体节和神经管中部区域高表达,影响体节形成和基板细胞分化,而 mdkb 则表达于神经管背部区域,促进神经嵴细胞生长^[8,14-15]。异育银鲫中, CagMdkb 蛋白在胚胎早期广泛分布,18 体节时定位于一对巨大的神经元上,并且注射过量的 CagMdkb 可导致异育银鲫脑部发育不全。这些结果表明,鱼类中 MK 具有不同于哺乳动物的多种功能和活性^[16]。迄今为止, 鲟鳇鱼类中未见相关的基因克隆和蛋白功能研究,因此,如能从鲟鳇鱼类

收稿日期:2012-02-08 修回日期:2012-12-23

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A402,2012AA10A401)

通信作者:张全启, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

入手,研究其 MK 基因是否存在同样的特殊功能活性,对于进一步研究 MK 基因具有重要意义。

本实验室从已经构建的半滑舌鳎 cDNA 文库中筛选获得了 MK cDNA 全长,发现其仅在成鱼的脑中表达,并参与胚胎的脑部发育过程。为进一步研究半滑舌鳎 MK 基因的功能,必须获得具有生物学活性的 MK 蛋白,因此,本研究通过 SOEing PCR 方法改造 MK 基因,构建原核表达载体 pET32a(+)-MK,并通过诱导表达成功获得可溶性重组蛋白 MK,为研究其生物学功能奠定了良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)pLysS、原核表达载体 pET32 a(+)均系本实验室收藏;Pfx DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Not* I 均购自 Fermentas 公司;异丙-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Promega 公司;琼脂粉购自上海生工;质粒抽提与 DNA 凝胶回收试剂盒购自天根公司;肽分子量标准蛋白购自北京康为世纪生物科技有限公司;其余常用试剂均为国产分析纯。

表 1 MK 定点改造所用扩增引物
Tab.1 Primers for amplification of modified MK fragments

引物名称 pimer name	序列(5'-3') primer sequence
Mk-F1	CGGAATTCAACCGCCGCGCAAAGAACC
Mk-R1	GTCGCGCAGACCTTCACCACAGTCACCGT
Mk-2	TGGTGAAGGTCTGCGCGACGCCACCTGTAAGGACCAGACCACCCGTATCAGCTGCCGTA
Mk-F3	CGTATCAGCTGCCGTATCCCGTGCAACTGGCGTAAG
Mk-R3	TTAGCTGGACTTCTTATCACCGGGGTGCG
Mk-R4	TATGCGGCCGCTTAGCTGGACTTCTTATCACCGC

1.2 实验方法

引物序列的设计 根据本实验室已获得的 MK 基因全长(GenBank 登录号:JQ619874),利用 Signal P 3.0 server 对其进行信号肽预测。选用大肠杆菌偏爱的密码子,利用 DNASTar、Primer Premier 5.0 等软件设计合成 6 个基因片段(表 1)(桑尼公司),用于扩增改造后的 MK 成熟肽编码序列,其中 Mk-R1 与 Mk-2、Mk-2 与 Mk-R3 分别有 19 和 16 bp 的互补序列,符合重叠延伸 PCR(gene SOEing, gene splicing by overlap extension)要求。

MK 基因的 SOEing PCR 合成 运用 SOEing PCR 法合成 MK 成熟肽序列。所有 PCR 反应均以高保真酶反应体系进行。

第一轮 PCR 反应条件:以 MK cDNA 全长质粒为模板,分别以 Mk-F1 与 Mk-R1, Mk-F3 与 Mk-R3 两对引物扩增基因片段,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 每循环降低 1 $^{\circ}$ C, 循环 10 次; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。目的片段琼脂糖检测并切胶回收后分别命名为 MK1、MK3。

第二轮 PCR 反应条件:以等量的 MK1、MK3 和合成的 Mk2 为模板,以引物 Mk-F1 与 Mk-R4 扩增基因片段,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94

$^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取上述 PCR 产物 1 μ L 做模板再次进行 PCR, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。电泳检测 PCR 产物后,胶回收 PCR 产物并克隆至 pMD18-T 载体中,测序鉴定序列。

原核表达质粒的构建 含半滑舌鳎重组 MK 的质粒与 pET32a(+)质粒均以 *EcoR* I 和 *Not* I 内切酶双酶切 2 h 后,酶切产物回收,并以 T₄ DNA 连接酶进行连接过夜,转化至 DH5 α 感受态细胞。经含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基培养后,挑单克隆经 PCR 鉴定,测序验证构建的重组表达载体 pET32a(+)-MK 序列。

工程菌株的筛选及目的蛋白的诱导表达 将含有重组表达载体 pET32a-MK 的阳性克隆提取质粒,并转化进宿主菌 BL21(DE3)pLysS,在终浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素与 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板中培养,并以 Mk-F1 与 Mk-R4 为引物进行 PCR 反应,筛选工程菌株并测序确定。

以 pET32 a(+)空质粒转化子为阴性对照,挑取工程菌株单克隆接种于 LB 培养液中(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素与 34 μ g/mL 氯霉素)37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。将活化菌以 1:50 接种于 15 mL 的

LB 培养液中(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素与 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素)37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养,当 OD_{600} 约为 0.6 时加诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L ,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 8 h,期间分别在诱导后 0、2、4、6 和 8 h 取 1 mL 菌液,6 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,经 15% SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白在不同时间的表达情况。

诱导 2 h 后离心并称取湿重,按照 1 g:(10~50) mL 的比例加入裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L , EDTA 20 mmol/L , NaCl 100 mmol/L , Triton-100 0.5%)重悬细胞,并超声波破碎细胞,12 000 r/min ,离心 10 min 收集裂解上清液及沉淀,经 15% SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的表达形式。

2 结果

2.1 SOEing PCR 合成目的基因

第一轮 PCR 结果扩增产物 Mk1 和 Mk3 都可见清晰的特异性条带(图 1-1、2),切胶回收与预期值相符的目的片段后,进行第二轮 PCR,最终扩增得到一条 400 bp 左右的特异性条带(图 1-3),片段大小与预期值相符。因此,将该片段进行琼脂糖凝胶电泳纯化回收后经连接、转化后

测序,经验证该特异性条带即突变后的半滑舌鳎 MK 成熟肽核苷酸序列,预期位点均实现了定点突变,并且未引入其他突变(图 2),因此可用于后期的克隆和原核表达载体构建。

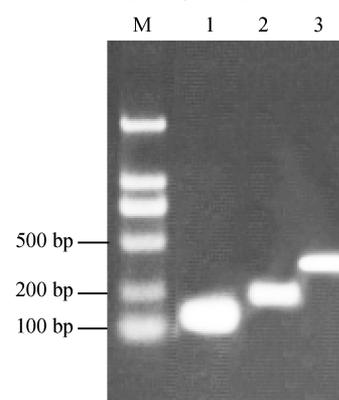


图 1 SOEing PCR 扩增产物的电泳分析结果

1. 第一轮 PCR 扩增产物 Mk1; 2. PCR 扩增产物 Mk3; 3. 第二轮 PCR 最终扩增产物; M. DNA marker(DL2000)。

Fig. 1 Electrophoresis analysis of fusion products by SOEing PCR

1. PCR product named Mk1 by the first cycle; 2. PCR product named Mk3 by the first cycle; 3. fusion product by the second cycle; M. DNA marker(DL2000).

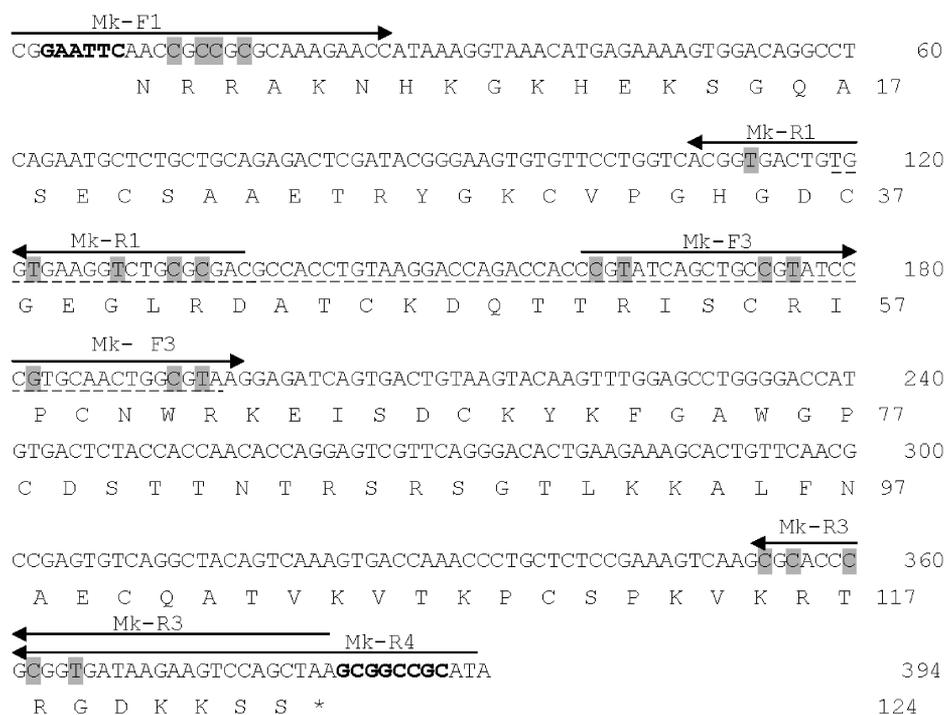


图 2 经改造后 MK 基因和编码的氨基酸序列

加粗字体为分别添加的 *EcoR* I 及 *Not* I 酶切位点,阴影为修改后的碱基,箭头示所用引物位置,虚线所指序列为合成的 Mk2。

Fig. 2 The nucleotide and amino acid sequences of MK gene after SOEing PCR modification

EcoR I and *Not* I restriction sites are highlighted in bold. The nucleotides changed by SOEing PCR are shadowed. The synthesized Mk2 is marked by dotted line. All the primers are shown by arrows.

2.2 原核表达质粒的鉴定

原核表达载体 pET32a-MK 转化 DH5 α 感受态细胞,质粒提取进行酶切鉴定(图 3),与对照质粒相比,pET32a-MK 质粒双酶切后有 400 bp 左右的目的条带。将经测序验证的阳性克隆提取质粒后,转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 菌株后菌落 PCR 筛选阳性克隆,结果发现阳性率 100%,且条带一致(图 4),挑取 1 号克隆进行测序,结果显示为突变后的目的基因并且没有引入其他突变。加甘油保存菌种于 -80°C ,待用。

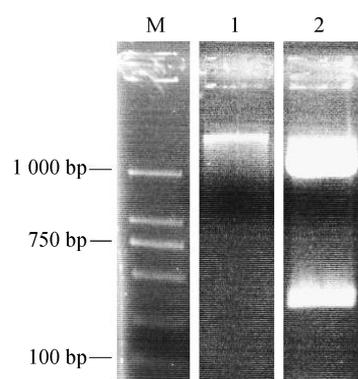


图 3 pET32 a(+) 和 pET32a-MK 质粒的双酶切结果
Fig.3 Duple enzyme digestion pattern of control vector and pET32a-MK

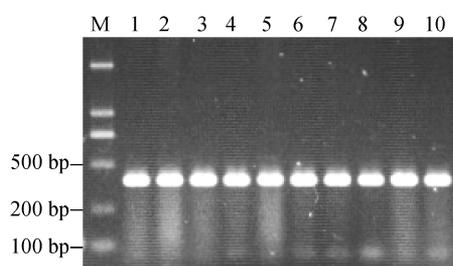


图 4 菌落 PCR 鉴定阳性克隆

1~10 均含有重组的 pET32a-MK; 均为阳性克隆; M. DNA marker(DL2000)。

Fig.4 Identification of recombinant plasmid by PCR
1-10. all positive clones detected by PCR; M. DNA marker (DL2000).

2.3 重组蛋白的诱导表达和可溶性分析

将测序验证后的阳性重组表达菌株活化、培养并经 IPTG 诱导表达,将诱导后 0、2、4、6、8 h 及空质粒诱导后 0、8 h 的细菌总蛋白以 15% SDS-PAGE 检测,结果显示,与阴性对照空载体表达产物及诱导前菌体相比,重组表达质粒诱导 2 h 后即开始在分子量大约 33 ku 处有明显的表达条带,蛋白质大小与推测的理论值一致,蛋白表达量

此后不再明显增加,杂蛋白增多(图 5)。因此,初步推测重组蛋白成功表达,且最佳诱导时间为 2 h。

诱导后的全菌体经超声破碎后,分别取上清液、沉淀进行 15% SDS-PAGE 检测,结果显示重组蛋白多存在于上清液中,为可溶性表达(图 6)。

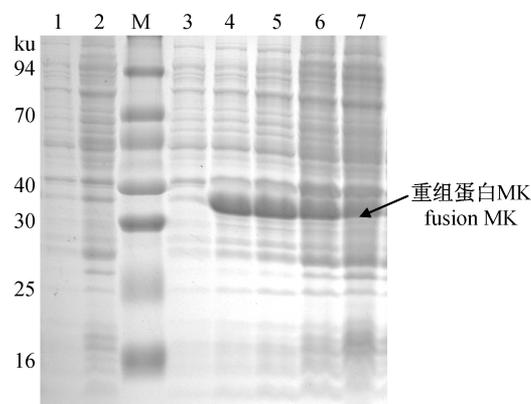


图 5 不同诱导时间下重组蛋白 MK 表达的 SDS-PAGE 分析

1. pET32 a(+)空质粒转化子未诱导; 2. pET32 a(+)空质粒转化子诱导后 8 h; 3. 重组菌未诱导; 4~7. 重组菌株经 IPTG 诱导后 2、4、6 和 8 h; M. 中分子量蛋白 marker。

Fig.5 Expression of fusion MK in *E. coli* host strain BL21(DE3)pLysS at different induction time

1. uninduced control; 2. control samples collected after induction by IPTG for 8 h; 3. uninduced samples; 4-7. samples collected after induction by IPTG for 2, 4, 6 and 8 h, respectively; M. protein marker.

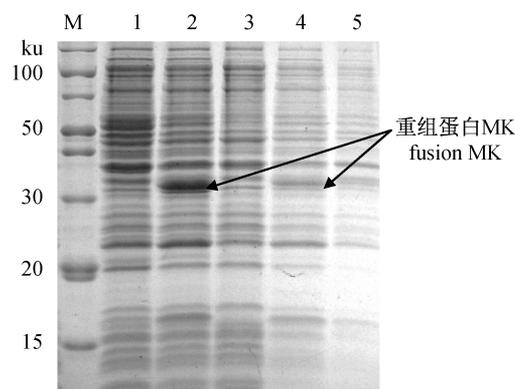


图 6 重组蛋白诱导表达形式的 SDS-PAGE 分析

1. pET32 a(+)空质粒转化子诱导后 2 h; 2. 重组菌株诱导后 2 h; 3. 重组菌株未诱导; 4. 超声裂解上清; 5. 超声裂解沉淀; M. 中分子量蛋白 marker。

Fig.6 Determination of the fusion MK solubility

1. control samples collected after IPTG induction for 2 h; 2. samples collected after IPTG induction for 2 h; 3. uninduced samples; 4. sonicated supernatant; 5. sonicated pellet; M. protein marker.

3 讨论

肝素结合生长因子 MK 具有广泛的生物学活性,如神经营养化,纤维化,血管再生和致癌活性等,目前已成为多种疾病治疗中颇具前景的分子靶点。人的 MK 蛋白含 121 个氨基酸残基,富含碱性氨基酸和半胱氨酸,是一种 13 ku 的分泌性肝素结合生长因子。生化研究表明, MK 形成二聚体,从而结合到受体酪氨酸激酶 RPTP β /PTP ζ ^[17]。同时, MK 也能激活 MAPK 和 PI3 激酶途径。MK 可以体外诱导造骨细胞的迁移,这一过程需要 MK 结合到 RPTP β /PTP ζ , 激活 MAPK 途径^[18]。半滑舌鳎 MK 蛋白也属于分泌型蛋白,具有一个对其受体 PTP ζ 必不可少的精氨酸残基^[17],并且具有 10 个高度保守的半胱氨酸。二者结构的保守性以及功能上存在的差异,需要未来研究人员对功能进一步的研究,而有活性的 MK 蛋白则是这些研究的基础。

大肠杆菌作为基因工程开发最早的表达系统,由于具有生产成本低,生长迅速,能大规模发酵,外源基因表达水平高,下游技术很成熟,易于控制等优点,仍是目前最常用的外源蛋白表达系统^[19]。外源基因在大肠杆菌中的表达水平受多种因素影响,其中,由于原核生物的基因对同义密码子的使用具有非随机性^[20],富含大肠杆菌不常用密码子的真核基因可能在大肠杆菌中得不到有效表达。鉴于此原因,本实验利用 SOEing PCR 方法对目的基因进行了改造。根据大肠杆菌密码子偏好性,本实验分别设计、合成了两对引物和一段 59 bp 长的片段,三者之间分别有 19 和 16 bp 的重叠部分,同时采用高保真 Pfx DNA 聚合酶减少 PCR 重叠延伸过程中的错误,成功对半滑舌鳎 MK 成熟肽序列进行了碱基突变,获得了密码子偏爱性改造的突变体。该方法简单有效,耗时短,成本低,可作为一种常规方法用于同源重组片段的构建^[21]、基因敲除^[22]、长片段基因的合成^[23]等研究,为许多基因、蛋白方面的研究提供了一种简单可行的实验技术。

虽然原核表达系统有很多优势,但真核基因转入原核细胞中表达同样存在着许多的不利因素,例如缺少翻译后加工修饰系统,蛋白往往以包涵体形式存在,蛋白的复性比较困难等等,正确选择合适的载体和宿主菌则有利于提高目的蛋白可

溶部分比例及活性。人类成熟肽 MK 原核表达载体已成功构建并被诱导,但主要以包涵体形式存在^[24-25],需进行包涵体的变性复性工作,不利于后期的基因功能验证以及应用。

本实验中,由于半滑舌鳎 MK 蛋白具有 10 个高度保守的半胱氨酸,并在分子内形成五对二硫键,因此我们选用原核表达载体 pET32 a(+),该载体带有 S Tag、His Tag 和 Trx Tag 标签,以及凝血酶和肠激酶位点。硫氧化还原蛋白 Trx 和目的蛋白进行融合表达,可催化二硫键形成并促进目的蛋白正确折叠,改善其溶解性,避免包涵体形成。His Tag 和 S Tag 可用于重组蛋白的亲纯化和 Western-blotting 检测,凝血酶和肠激酶位点可用于后期切去融合序列。通过选择合适的载体,本实验中半滑舌鳎重组蛋白 MK 最终获得了成功的诱导表达,半滑舌鳎 MK 成熟肽 13 ku 与载体标签蛋白 20 ku 融合表达约为 33 ku 的重组蛋白,并主要以可溶形式存在。半滑舌鳎重组蛋白 MK 表达载体的构建及可溶形式的成功表达,为研究半滑舌鳎 MK 的结构和功能奠定了基础。在本实验的基础上,可通过重组蛋白纯化与活性检测、抗体制备、体外细胞系检测其表达水平以及鱼体注射检测上下游基因的表达变化等多种形式,进一步诠释半滑舌鳎生长因子 MK 的功能和调控。

参考文献:

- [1] Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, 151 (3): 1312 - 1318.
- [2] Kadomatsu K, Huang R P, Sukanuma T, *et al.* A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1990, 110(3): 607 - 616.
- [3] Michikawa M, Kikuchi S, Muramatsu H, *et al.* Retinoic acid responsive gene product, Midkine, has neurotrophic functions of mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in culture [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 1993, 35(5): 530 - 539.

- [4] Fan Q W, Muramatsu T, Kadomatsu K. Distinct expression of midkine and pleiotrophin in the spinal cord and placental tissues during early mouse development [J]. *Development, Growth and Differentiation*, 2000, 42(2): 113 - 119.
- [5] Gatver R I, Radford Jr D M, Donis-keller H, *et al.* Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue [J]. *Cancer*, 1994, 74 (5): 1584 - 1590.
- [6] 赵秋,马松林,王渝,等. Midkine 在胰腺癌组织中的表达及临床意义 [J]. *胰腺病学*, 2006, 6 (6): 337 - 339.
- [7] Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, *et al.* Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma [J]. *Oncology*, 1999, 57 (3): 253 - 257.
- [8] Winkler C, Schafer M, Duschl J, *et al.* Functional divergence of two zebrafish midkine growth factors following fish-specific gene duplication [J]. *Genome Reserch*, 2003, 13(6A): 1067 - 1081.
- [9] Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer [J]. *Cancer Letters*, 2004, 204(2): 127 - 143.
- [10] Takei Y, Kadomatsu K, Matsuo S, *et al.* Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells [J]. *Cancer Research*, 2001, 61(23): 8486 - 8491.
- [11] 李克,马百坤,张春妮,等. Midkine 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2002, 9 (3): 268 - 271.
- [12] 钱海华,康晓燕,殷正丰,等. 重组人中期因子的原核表达、纯化及生物学活性鉴定 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(4): 394 - 397.
- [13] 王跃华,张青云. 细胞因子 *midkine* 基因的克隆及其转化甲醇酵母 *Pichia pastoris* [J]. *山西医科大学学报*, 2005, 36(6): 677 - 680.
- [14] Winkler C, Moon R T. Zebrafish mdk2, a novel secreted midkine, participates in posterior neurogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2001, 229 (1): 102 - 118.
- [15] Schafer M, Rembold M, Wittbroadt J, *et al.* Medial floor plate formation in zebrafish consists of two phases and requires trunk-derived Midkine-a [J]. *Genes & Development*, 2005, 19(8): 897 - 902.
- [16] Yin J, Xia J H, Du X Z, *et al.* Developmental expression of *CagMdkb* during gibel carp embryogenesis [J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2007, 51(8): 761 - 769.
- [17] Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, *et al.* A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTP ζ /RPTP β binds a heparin-binding growth factor midkine [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 12474 - 12479.
- [18] Qi M, Imatsu S, Maeda N, *et al.* Haptotactic migration induced by midkine; Involvement of protein-tyrosine phosphatase ζ , mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 15868 - 15875.
- [19] 李元,陈松森,王渭池. 基因工程药物 [M]. 北京: 化学出版社, 2002.
- [20] Gutana G A, Hatfield G W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 1989, 86(10): 3699 - 3703.
- [21] 李敏,杨谦. 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法—融合 PCR [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27 (8): 53 - 58.
- [22] Kuwayama H, Obara S, Morio T, *et al.* PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(2): e2.
- [23] Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, *et al.* A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (12): e98.
- [24] 薛永涛,黄文晋,石斌,等. MK 表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 5(1): 56 - 60.
- [25] 张青云,杨敏,王雅明,等. 细胞因子 Midkine 融合蛋白的表达及其单克隆抗体的制备与应用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(5): 605 - 608.

The site-directed mutagenesis and prokaryotic expression of *midkine* gene in *Cynoglossus semilaevis*

WANG Yanan^{1,2}, LIU Xudong^{1,3}, MU Linlin¹, LIU Zhipeng¹, LI Chunmei¹,
YU Haiyang¹, ZHANG Quanqi^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education,

College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Ocean and Fisheries Bureau of Qingdao, Qingdao 266071, China;

3. North China Sea Environment Monitoring Center, State Oceanic Administration, Qingdao 266033, China)

Abstract: Midkine is a kind of heparin-binding cytokine, and it promotes growth, survival, migration and other activities of target cells. The expression of fusion protein MK will facilitate further studies for its biological functions in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Based on the plasmid containing full length of half-smooth tongue sole MK cDNA sequence, the site-directed mutagenesis of predicted mature MK sequence was successfully obtained by SOEing PCR method according to the *E. coli* codon bias. After being confirmed by sequencing, the resulting gene was cloned to the vector pET32a(+) to yield an identified recombinant plasmid pET32a(+)-MK, which was then transformed into *E. coli* host strain BL21(DE3)pLysS. SDS-PAGE analysis revealed that high level of fusion protein MK was induced by 1 mmol/L IPTG at 37 °C and was mainly detected in sonicated supernatant. The yielded fusion protein MK was approximately 33 ku which was in accordance with the theoretical molecular weight. This study establishes the basis for further study for its detailed functions in half-smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; midkine; prokaryotic expression; fusion protein

Corresponding author: ZHANG Quanqi. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn