

doi:103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 027

家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 重组蛋白 表达及纯化研究

阎振鑫, 莫春横, 王亚军, 李娟

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 本文以家鸡冷冻垂体组织为模版, 克隆了 TSH β 、亚基 FSH β 亚基和 LH β 亚基的部分特异性功能片段, 并用 pET 原核表达系统构建了它们的原核表达质粒: pET32a-TSH β 、pET28a-FSH β 和 pET32a-LH β . 利用大肠杆菌 BL21(DE3) 和 Rosetta-gamiTM 菌株摸索到高效重组表达 pET32a-TSH β 、pET28a-FSH β 和 pET32a-LH β 的 IPTG 诱导浓度分别为: 200 μ M、25 μ M 和 15 μ M. 并在此基础上利用镍离子亲和层析蛋白纯化技术对重组蛋白进行了纯化.

关键词: TSH β ; FSH β ; LH β ; 基因克隆; 重组蛋白表达; 蛋白纯化

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0163-06

Expression and purification of recombinant chicken TSH β , FSH β , and LH β proteins

YAN Zhen-Xin, MO Chun-Heng, WANG Ya-Jun, LI Juan

(Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, 610065, China)

Abstract: In this paper, part of special function DNA fragments of Thyroid-stimulating hormone (TSH) β subunit, Follicle-stimulating hormone (FSH) β subunit and Luteinizing hormone (LH) β subunit were cloned from frozen chicken pituitary. And their prokaryotic express plasmids were constructed in pET system: pET32a-TSH β , pET28a-FSH β and pET32a-LH β . The most effective concentration of inductor, IPTG, is 200 μ M, 25 μ M and 15 μ M for them, individually, in BL21(DE3) and Rosetta-gamiTM strain. Based on these work, the proteins were purified by nickel affinity chromatograph.

Key words: TSH β ; FSH β ; LH β ; Gene cloning; Recombinant protein; Protein purification

1 引言

垂体前叶分泌的促性腺激素(促卵泡激素 FSH 和黄体生成素 LH)和促甲状腺激素(TSH)均是由 α 和 β 两个亚基通过非共价键组成糖蛋白, 糖基通过共价键结合于肽链上的天冬酰胺残基、丝

氨酸残基或苏氨酸残基^[1, 2]. TSH、FSH 和 LH 的 α -肽链结构相同, 但 β -肽链各有特征, 从而造成了上述各激素的功能特异性.

在哺乳动物中, 促卵泡激素(FSH)和黄体生成素(LH)都分泌于垂体促性腺激素细胞^[3], 它们的生成和分泌主要受下丘脑促性腺激素释放激素

收稿日期: 2014-04-11

基金项目: 国家自然科学基金(31172202)

作者简介: 阎振鑫(1987-), 男, 山东寿光人, 硕士, 研究方向为细胞的分子生物学. E-mail: yanzhenxin@yeah.net

通讯作者: 李娟. E-mail: lijuanhk@gmail.com

(GnRH)的直接调控^[4, 5]. 在雌性动物中, 促卵泡激素(FSH)通过其特异性受体—促卵泡激素受体(FSHR)—的介导来促进卵巢中卵泡的生长和发育^[6], 黄体生成素(LH)则通过黄体生成素受体(LHR)的介导来刺激卵巢分泌雌激素^[7], 同时协同促卵泡激素(FSH)维持卵巢的月经周期, 导致排卵与黄体的生成. 在雄性动物中, FSH 和 LH 在促进睾丸曲细精管的成熟、精子生成和雄性激素的分泌过程中具有重要作用^[8]. 促甲状腺激素(TSH), 是由垂体前叶的促甲状腺激素细胞分泌的糖蛋白类激素. 促甲状腺激素(TSH)通过促甲状腺激素受体(TSHR)介导, 不仅能刺激甲状腺分泌甲状腺素(T₄)和三碘甲腺原氨酸(T₃)^[9]而且可以直接刺激身体的其他器官发挥作用. 研究人员发现在淋巴球、大脑、胸腺、睾丸、卵巢、肾脏、脂肪、心脏、骨等器官都有 TSHR 的表达^[10, 11]. 在哺乳动物中, 下丘脑促甲状腺激素释放激素(TRH)可以高效的刺激 TSH 的生成与分泌^[12].

与哺乳动物中的情况一致, TSH、FSH 和 LH 也是由垂体产生, 参与调控鸟类代谢和生殖等生理过程的重要激素. 然而, 由于三种激素特异性抗体的缺乏, 导致针对三种激素在鸟类垂体中的细胞定位及其表达调节机制研究相对不足. 因此, 本研究拟在细菌中表达并纯化三种重要激素 β 亚基重组蛋白, 用于后续多克隆抗体制备.

2 材料与方法

2.1 材料和试剂

2.1.1 菌种与质粒 pET28(a)和 pET32(a)质粒和 DH5 α 大肠杆菌菌株 BL21(DE3)和 Rosetta-gamiTM均有本实验室保存.

2.1.2 主要试剂及动物材料 本实验所用的动物材料均取自于成都市场. 取成都当地成年母鸡垂体组织于灭菌生理盐水中洗净, 清洗后装于 1.5mL 离心管立即放入液氮中保存. 高保真 PCR 使用的 KOD-Fx 高保真 DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; M-MLV, Madison, 反转录酶购自 Promega 公司; 基因克隆过程中使用的 Easy Taq 体系、连接酶、限制性内切酶和缓冲液 Buffer 等试剂均购于 Takara 公司; HisPur Ni-NTA Resin and Kits 购于 Thermo Scientific 公司; Protein Assay 蛋白定量试剂盒购于 Bio-Rad 公司; 提取动物组织 RNA 用 TRIzol Reagent 购于 Invitrogen 公司; 引物由成都金杰生物有限公司完成; 基因序列测定工作由北京华大六和股份有限公司完成. 化学试剂除特别标明, 均为国产分析纯.

2.2 方法

2.2.1 引物设计 利用家鸡 *TSH β* (NCBI 序列号: NM_205063.1), *FSH β* (NCBI 序列号: NM_204257.1)和 *LH β* (NCBI 序列号: HQ872606.1)基因 mRNA 序列信息, 设计了家鸡 *TSH β* 、*FSH β* 和 *LH β* 基因克隆的特异引物, 用于扩增编码其成熟肽部分区段的 cDNA(见表 1).

2.2.2 家鸡总 RNA 提取 取冷冻的家鸡垂体组织, 向离心管中加入 300 μ L RNAzol, 用电动转子研磨粉碎后按照 Total RNA Extraction Kits 说明书的步骤提取垂体组织的总 RNA. 最后沉淀的 RNA 用 DEPC-H₂O 溶解. 取 1 μ L 总 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测, 同时测定 RNA 浓度, 将总 RNA 储存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用.

2.2.3 RT-PCR 以成年家鸡垂体组织总 RNA 为模板进行反转录. 具体步骤按反转录试剂盒操

表 1 *TSH β* 、*FSH β* 、*LH β* 基因克隆所用引物

Tab. 1 Primers used for cloning *TSH β* 、*FSH β* 、*LH β* gene

基因名称	引物名称	引物序列	备注
TSH β	TSH-U1	5'-CGCGGATCC <u>igtgtccttcagagtaca</u> -3'	
	TSH-L1	5'-CCCAAGCTT <u>catttctgccactgtctgt</u> -3'	368bp
FSH β	FSH-U1	5'-CCGGAATTC <u>acgtgggtgctcaggatactg</u> -3'	
	FSH-L1	5'-CCCAAGCTT <u>gctgccatatacaagtacctc</u> -3'	287bp
LH β	LH-U1	5'-CGCGGATCC <u>gtaacgggtggcggaggagaa</u> -3'	
	LH-L1	5'-CCCAAGCTT <u>gggccggtctctattatttc</u> -3'	334bp

注: 下划线表示设计引物时添加的限制性内切酶酶切位点

Note: The restriction enzyme sites added to primers are underlined

作说明进行, 将所得的反应产物用 DEPC-H₂O 稀释 5 倍, 即得 cDNA 模板. 利用管家基因 β -ACTIN 检测 cDNA 模板质量和反转录效率^[13, 14], 反应体系为 10 μ L, 其中加入 cDNA 模板 2 μ L, 56 $^{\circ}$ C 退火, 共进行 26 个循环. 琼脂糖凝胶电泳检测合格的模板可用于家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 的 PCR 扩增.

2.2.4 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 的克隆 以家鸡垂体组织 cDNA 为模板, 进行 TSH β 、FSH β 和 LH β 三个基因成熟肽段的 cDNA 扩增. PCR 反应体系为: 2 \times KOD Buffer 25 μ L, 2mM dNTPs 10 μ L, cDNA 模板 5 μ L, 上下游引物 (20 μ M) 各 0.75 μ L (终浓度 0.3 μ mol/L), KOD-Fx 聚合酶 (1U/ μ L) 2.5 μ L, 用 MilliQ-H₂O 补足 50 μ L. TSH β 、FSH β 、LH β 三个基因 PCR 扩增反应条件同为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10min. 最后后取 2 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测.

纯化回收 TSH β 、FSH β 和 LH β 的 PCR 扩增产物. TSH β 和 LH β 使用限制性内切酶 BamHI 和 HindIII, FSH β 使用 EcoRI 和 HindIII 与 pET 载体分别进行双酶切并纯化回收, 将 PCR 酶切回收产物与 pET28a/32a 载体进行粘末端连接并转化到 *E. coli* DH5 α 细胞中. 利用基因特异性上游引物与 T7-Terminator 引物进行菌落 PCR 筛选, 将筛选到的阳性克隆进行质粒提取和酶切检测, 测序鉴定.

2.2.5 序列分析和比对 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获得家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 的 mRNA 序列; 利用 laser-gene 中 MegAlign 和 EditSeq 软件对测序结果进行比对分析, 确定重组质粒的是否正确.

2.2.6 TSH β 、FSH β 和 LH β 重组质粒的原核表达 将构建的 pET28a 和 pET32a 重组质粒分别转化入 BL21 (DE3) 和 Rosetta-gamiTM 大肠杆菌中, 涂布在对应抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养. 用 PCR 法筛选阳性克隆并保种. 将阳性克隆接种入 3mL LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、250r/min, 摇至 OD₆₀₀ = 0.6; 分别使用终浓度为 50 μ M、100 μ M、200 μ M、300 μ M 的 isopropyl- β -d-thiogalactoside (IPTG) 来诱导表达, 37 $^{\circ}$ C、250r/min、6h. 4 $^{\circ}$ C、4500r/min 离心 5min 收集菌体, 菌体加入 2 \times SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 10min 以裂解细菌, SDS-PAGE (12% 分离胶) 分析各个菌株表达蛋白情况.

在合适的 IPTG 浓度诱导下将工程菌扩大培养, 收集菌体, 将菌体用 PBS 清洗后用蛋白纯化平衡液 (含 10mM 咪唑的 20mM PBS) 重悬, 超声波破碎 (6mm 探头, 裂解 4s, 暂停 8s, 35% 功率, 裂解 45min), 裂解全程冰水浴并且在裂解前加入 1% Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 以抑制蛋白降解. 将裂解好的菌液 4 $^{\circ}$ C、10000r/min, 离心 15min; 取沉淀加入适量蛋白纯化平衡液 (含 6M 尿素) 溶解沉淀 (主要为包涵体), 上清留样. 在加 IPTG 前取 1mL 菌液作为负对照, 在裂解前取 1mL 作为正对照. SDS-PAGE (12% 分离胶) 分析再次确认重组蛋白表达情况.

2.2.7 TSH β 、FSH β 和 LH β 重组蛋白的镍柱纯化及蛋白浓度的测定 按照 HisPur Ni-NTA Resins and Kits 的说明书进行蛋白的纯化操作. 配制咪唑洗脱浓度梯度为 25mM、50mM、75mM, 用 250mM 咪唑将目标蛋白完全洗脱. SDS-PAGE 检测蛋白纯度 (纯度要达到 85% 以上).

纯化后的蛋白按照操作说明使用 Millipore 超滤管进行透析和浓缩; 将咪唑浓度降至小于 30mM, 尿素浓度尽量降低, 可加入适当浓度的甘油以助溶.

依据 Bio-Rad Protein Assay 试剂盒的操作说明进行蛋白浓度定量操作.

3 结果

3.1 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 基因的克隆

本研究基于家鸡 TSH β (NCBI 序列号: NM_205063.1), FSH β (NCBI 序列号: NM_204257.1) 和 LH β (NCBI 序列号: HQ872606.1) 基因 mRNA 序列信息设计了序列特异性引物 (见表 1). 以垂体组织的 cDNA 为模板扩增家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 三个基因的成熟肽的 cDNA 片段. 如图 1 琼脂糖凝胶电泳所示, TSH β 、FSH β 和 LH β 三个基因扩增结果分别为 368bp、287bp 和 334bp, 理论编码蛋白大小分别为 15kD、14.7kD 和 16kD. 经酶切检验和测序, 证明是正确的 PCR 扩增.

3.2 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 基因表达载体的构建

本实验中将 pET28a 和 pET32a 作为原核表达载体. 我们将 PCR 产物及质粒纯化回收、双酶切 (TSH β 和 LH β 用 BamHI 和 HindIII 双酶切, FSH β

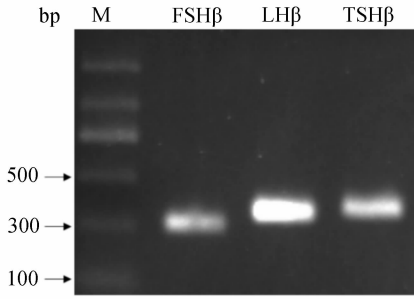


图 1 家鸡 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 基因成熟肽 cDNA 片段 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳。利用 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 三个基因的特异性引物扩增得到分别为 368bp、287bp、334bp 的正确片段

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of chicken $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ and $LH\beta$ gene mature protein region PCR products. Using the special Primers of $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ and $LH\beta$, PCR were performed and get 368bp、287bp、334bp right-bands

用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切)、连接得到 pET28a- $FSH\beta$ 、pET32a- $TSH\beta$ 和 pET32a- $LH\beta$ 三个重组质粒。

3.3 家鸡 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 重组蛋白的诱导表达

将 pET28a- $FSH\beta$ 转化到 BL21 (DE3), pET32a- $TSH\beta$ 和 pET32a- $LH\beta$ 则分别转化到 Rosetta-gamiTM 菌株中, 经抗性筛选和特异引物 PCR 菌落筛选得到含有重组质粒的工程菌。用 SDS-PAGE 技术检测 IPTG 浓度梯度诱导效果 (如图 2)。图 2(A)、图 2(B) 和图 2(C) 中分别检测到 19.2kD 的 $FSH\beta$ 融合蛋白 (蛋白理论值为 14.7kD, pET28a 标签约 4.5kD)、36kD 的 $LH\beta$ 融合蛋白 (蛋白理论值为 16kD, pET32a 标签约 20kD) 和 35kD 的 $TSH\beta$ 融合蛋白 (蛋白理论值为 15kD, pET32a 标签约 20kD); 它们的最佳 IPTG 浓度分别为 $200\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 和 $15\mu\text{M}$ 。

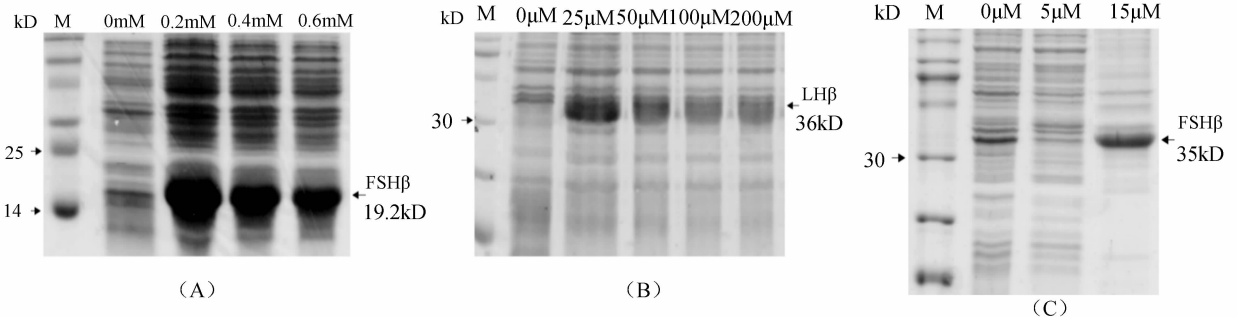


图 2 家鸡 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 蛋白原核表达的 IPTG 浓度梯度测试。

(A) $FSH\beta$ 蛋白诱导设置了 0mM、0.2mM、0.4mM、0.6mM 四个 IPTG 浓度梯度, $FSH\beta$ 融合蛋白大小约为 19.2kD (带 pET28 标签约 4.5kD); (B) $LH\beta$ 蛋白诱导设置了 $0\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 五个 IPTG 浓度梯度, $LH\beta$ 融合蛋白大小约为 36kD (带 pET32 标签约 20kD); (C) $TSH\beta$ 蛋白诱导设置了 $0\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 三个 IPTG 浓度梯度, $TSH\beta$ 融合蛋白大小约为 35kD (带 pET32 标签约 20kD)

Fig. 2 Test for proper concentration of IPTG for chicken $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ and $LH\beta$ prokaryotic expression.

(A) Designed 4 concentration gradients (0mM、0.2mM、0.4mM、0.6mM) for $FSH\beta$ and the fusion protein is about 19.2kD; (B) Designed 5 concentration gradients ($0\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$) for $LH\beta$ and the fusion protein is about 36kD; (C) Designed 3 concentration gradients ($0\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$) for $TSH\beta$ and the fusion protein is about 35kD

3.4 家鸡 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 重组蛋白的纯化

用含有不同咪唑浓度的蛋白洗脱缓冲液 (Wash Buffer), 浓度梯度洗脱杂蛋白, 得到 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 洗脱杂蛋白的最佳浓度均为 50mM 咪唑 (如图 3)。经 50mM 咪唑浓度清洗杂蛋白后, 用 250mM 咪唑洗脱目的蛋白, 我们得到了纯度约为 90% 的蛋白样品 (如图 4)。用超滤的方法将蛋白浓缩并除去咪唑降低尿素含量, 最后我们得到了 2mg/mL 的 $TSH\beta$, 1mg/mL 的 $FSH\beta$ 和 1mg/mL 的 $LH\beta$ 重组蛋白。蛋白溶解并

保存于含有 2M 尿素的 PBS 中 (咪唑浓度低于 30mM)。

4 讨论

我们通过 RT-PCR 技术成功克隆到了 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 三个重要垂体激素基因, 并且创建了有效的原核表达纯化系统。经 SDS-PAGE 检测, $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 重组蛋白的纯度均在 90% 以上, 这将为家鸡 $TSH\beta$ 、 $FSH\beta$ 和 $LH\beta$ 抗体的制备及其生理功能的研究奠定基础。

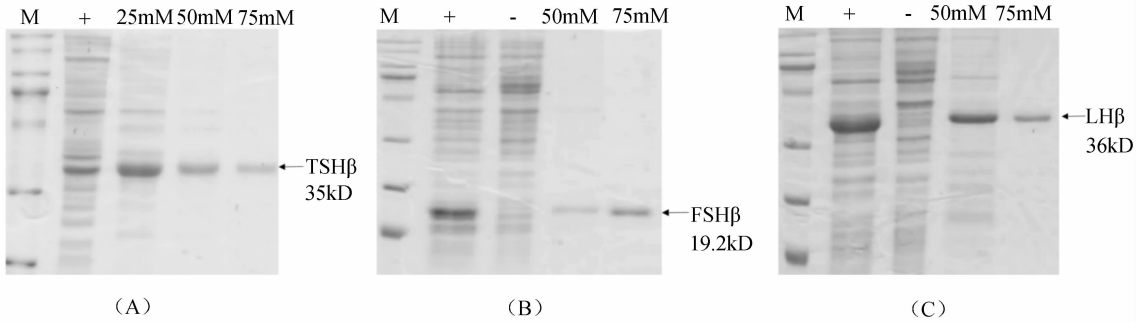


图 3 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 杂蛋白洗脱咪唑浓度梯度测试

(A) TSH β : 25mM、50mM、75mM; (B) FSH β : 50mM、75mM; (C) LH β : 50mM、75mM

Fig. 3 different concentrations of imidazole For removing other protein except chicken TSH β 、FSH β and LH β

(A) TSH β : 25mM、50mM、75mM; (B) FSH β : 50mM、75mM; (C) LH β : 50mM、75mM

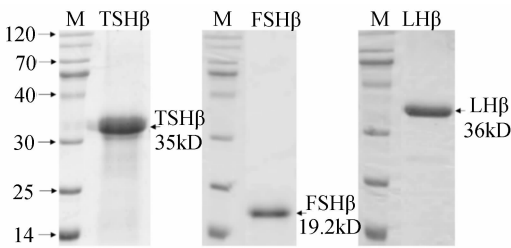


图 4 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析

从左到右依次是 Marker、TSH β (35kD)、Marker、FSH β (19.2kD)、Marker、LH β (36kD)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of TSH β 、FSH β and LH β purified products

From left to right the lanes are Marker, TSH β (35kD), Marker, FSH β (19.2kD), Marker, LH β (36kD)

4.1 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 重组蛋白的诱导

经检测 TSH β 、FSH β 和 LH β 的最佳 IPTG 诱导浓度分别为 200 μ M、25 μ M 和 15 μ M。在原核表达 TSH β 过程中, 我们做了大量的 IPTG 浓度梯度诱导, 但诱导效果均不佳。经过总结分析后发现: 极低浓度的 IPTG 便可以发挥巨大的作用。经过改进后, 我们顺利表达出了 TSH β 蛋白。工程菌中重组蛋白的表达量与培养基营养、生长温度^[15, 16]、蛋白生产速率(包括不同的因素, 如基因剂量、启动子活性、mRNA 稳定性等)等因子有关。为了提高重组蛋白的表达水平, 我们采用 37 $^{\circ}$ C, 200rpm, 200ml 体系培养工程菌, 经检测得到了大量的包涵体蛋白。包涵体是细菌高效表达重组蛋白的标志^[16], 而且包涵体蛋白用于制作抗体具有抗原识别位点多、抗体效价高、易于纯化、表达量大等优点。

4.2 家鸡 TSH β 、FSH β 和 LH β 重组蛋白的纯化

经过 50mM 咪唑浓度的 Wash Buffer 洗除杂

蛋白, 我们得到了纯度约为 90% 的蛋白样品(如图 5)。在蛋白纯化过程中, His 标签可以特异的与 NTA 表面整合的 Ni 离子结合(His 的侧链基团有咪唑基); 因此融合蛋白可以特异的结合到 Ni 柱表面, 而其他蛋白随溶液流出。当需要将目的蛋白洗脱时, 加入高浓度的咪唑可以跟 His 标签竞争 Ni 离子的结合位点, 将融合蛋白洗脱。

本研究选择尿素来溶解包涵体蛋白而不选择盐酸胍, 是因为盐酸胍毒性较强, 作为抗原溶剂注射会对动物产生较大的毒副作用。而且盐酸胍能特异的跟 SDS 结合形成固体沉淀, 从而使 SDS-PAGE 无法进行; 尿素毒性较小, 且对 SDS-PAGE 没有影响。为了降低蛋白的降解, 我们采用全程低温操作, 并在超声波裂解时加入 PMSF 抑制蛋白酶活性。表达的蛋白经 SDS-PAGE 检测跟预期大小一致。

本项研究为制作 TSH β 、FSH β 和 LH β 的多克隆抗体提供了抗原, 也为在鸟类中深入研究 TSH β 、FSH β 和 LH β 在垂体中的细胞定位及其表达调控研究奠定基础。

参考文献:

[1] Loreti N, Fresno C, Barrera D, *et al.* The glycan structure in recombinant human FSH affects endocrine activity and global gene expression in human granulosa cells [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 366(1): 68.

[2] Kovács M, Vincze B, Horváth J E, *et al.* Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-III analogs [J]. *Peptides*, 2007, 28 (4): 821.

- [3] Mullen M P, Cooke D J, Crowe M A. Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species [M]. // Vizcarra J. Gonadotropin Edition1: In-Tech. 2013, 155.
- [4] Sharif A, Baroncini M, Prevot V. Role of glia in the regulation of gonadotropin-releasing hormone neuronal activity and secretion [J]. *Neuroendocrinology*, 2013, 98(1): 1.
- [5] Kenealy B P, Kapoor A, Guerriero K A, *et al.* Neuroestradiol in the hypothalamus contributes to the regulation of gonadotropin releasing hormone release [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33(49): 19051.
- [6] Menon K M, Menon B. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors - a perspective [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 356(1-2): 88.
- [7] Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology [J]. *Endocrine Reviews*, 1997, 18(6): 739.
- [8] Simoni M, Weinbauer G F, Gromoll J, *et al.* Role of FSH in male gonadal function [J]. *Annales d'Endocrinologie*. 1999, 60(2): 102.
- [9] Tian L, Zhang L, Liu J, *et al.* Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Journal of Endocrinology*, 2014, 52(2): 215.
- [10] Neumann S, Eliseeva E, McCoy J G, *et al.* A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011, 96(2): 548.
- [11] de Lloyd A, Bursell J, Gregory J W, *et al.* TSH receptor activation and body composition [J]. *Journal of Endocrinology*. 2010, 204(1): 13.
- [12] Frank L A. Comparison of thyrotropin-releasing hormone (TRH) to thyrotropin (TSH) stimulation for evaluating thyroid function in dogs [J]. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 1996, 32(6): 481.
- [13] Wang Y, Ge W. Cloning of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor from the zebrafish ovary: evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(3): 749.
- [14] Wang Y, Ge W. Developmental profiles of activin betaA, betaB, and follistatin expression in the zebrafish ovary: evidence for their differential roles during sexual maturation and ovulatory cycle [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(6): 2056.
- [15] de Groot N S, Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(27): 6471.
- [16] Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies [J]. *Trends in Biotechnology*. 2006, 24(4): 179.