

基因工程鱼生长激素的生产研究

巫爱珍 孙玉昆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要 以 P_{RPL} , Trp 启动子在大肠杆菌中表达鲤鱼生长激素重组 DNA, 经过高密度发酵, 包涵体的提取, 恢复天然结构, 每升发酵可得 2g 鱼生长激素, 在上海地区以浸渍方法处理对虾苗并在人工饲料中添加鱼生长激素, 提高虾苗的存活率并增加产量, 提高了饲料的转化率。

关键词 基因工程鱼生长激素, 生产

水产养殖业的发展在我国国民经济中占有重要地位, 不仅增加农业收入, 改善人民生活, 水产品是重要的蛋白质来源之一。鱼生长激素是鱼类脑垂体中分泌的促进生长的蛋白质激素, 参与鱼的生长代谢, 促进其生长, 在水产养殖业鱼、虾人工饲料中常加入虾头粉以促进其生长, 实际上, 虾头粉中含有脑垂体所产生的生长激素在起促进生长作用。随着基因工程技术发展, 牛、猪生长激素都已工业化生产并能促进奶牛的产奶量以及猪的生长, 增加瘦肉比例, 提高饲料的利用率。应用生长激素于鱼、虾的养殖试验证明生长激素能促进鱼、虾的生长, 颇受养殖业的注意。如果将生长激素应用于水产养殖业, 需要解决二方面的问题; 一是利用基因工程技术大量提供产品, 二是生产激素的应用方法, 因为像牛、猪那样注射使用, 对鱼、虾是不可能的。近年的研究用生长激素浸渍或加入饲料中喂食, 生长激素表现了对鱼、虾有促进生长的效果^[1-9]。本文报道了我们对于鱼生长激素基因工程的生产及应用的研究结果。

1 材料与方 法

1.1 表达质粒的构建

为构建高效表达质粒, 我们将香港中文大学何国强教授惠赠的鲤鱼生长激素 fGH. cDNA 为基础进行修饰改造, 然后插入到含 P_{RPL} 和 Trp 启动子的表达质粒后得到 P_{RPL}/fGH 和 Trp/fGH。为构建上述质粒将 fGH. cDNA 克隆进 pGEM3Z 的 SmaI/XbaI 切点, 以 Sanger 双脱氧法进行精确的 DNA 序列分析, 根据序列分析的结果必需在 fGH 的成熟肽的 Ala 密码子 GCT 前加一个起始密码 ATG 才能插入表达质粒。为此设计合成了一对引物, 上游引物 5' - GAATTCACCATGGCTTCTGAAAACCGC, 下游为 5' - GTTCAA-CATAGAGCTCTT, 以原 fGHcDNA 为模板用 PCR 方法合成一段带有 ATG 起始密码从 Ala 的密码子 GCT 到 SacI 识别位点 GAGCTC 的 200 多碱基对的片段, 用它取代原来 fGH 的 cDNA 的相应部分, 最后将这改造了的 fGH 基因克隆至 pGEM3Z 中扩增, 再用 EcoRI 和 SalI 将 fGH 基因切出插入 P_{RPL} 表达质粒得 P_{RPL}/fGH 。用 EcoRI 和 PstI 将 fGH 基因切出插入到 Trp 表达质粒得到 Trp/fGH。

1.2 试剂

蛋白胨, 酵母抽提粉系 Sigma 公司, Difco 公司, Oxoid 或日本大五营养公司产品, 酸水

解蛋白脲 Sigma 产品,用于 Trp 启动子表达系统,尿素、盐酸胍,各种无机盐皆系国产品。

1.3 蛋白凝胶方法

按 Laemmli *et al* 的方法进行^[11]。

1.4 蛋白浓度测定

以牛血清蛋白为标准按文献[12]介绍方法进行。

1.5 鱼生长激素生物活性测定

委托中国科学院北京发育研究所进行。以 21 日龄 Wistar 幼大鼠,人工喂奶 7d,挑选体重在 70g 左右的供去垂体用。去垂体后,再喂养二周,其间隔天称一次,挑选增重少于 0.5g/d 的鼠供实验用,每天腹腔注射待测样品 50 μ g/d,对照鼠注射等量生理盐水,连续 4d,在末次注射后 24h 将鼠处死,检查垂体是否摘除干净,然后取出胫骨,矢状面剖开,硝酸银染色,显微镜下通过测微尺测量生长板宽度,最后得平均测量值,全部测得数据作统计分析。

1.6 鱼生长激素对黑鲟鱼、对虾的养殖应用研究

委托中国水产研究院、上海东海水产研究所进行。

1.7 发酵

1.7.1 菌种保存:基因工程菌于 LB 培养液中含氨苄青霉素 50 μ g/ml,在 30 $^{\circ}$ C 下,NBS 摇床、振荡培养 12h,加 15% 灭菌甘油,-40 $^{\circ}$ C~80 $^{\circ}$ C 下冷冻保存。

1.7.2 种子培养:每升培养液中含蛋白脲 10g,酵母粉 5g 及少量无机盐类,120 $^{\circ}$ C 灭菌 20min 后,接种冷冻保存的菌种,加氨苄青霉素 50 μ g/ml,NBS 摇床 30 $^{\circ}$ C 培养 12~14h,作为发酵的种子液。

1.7.3 发酵:应用 B. Braun. Biostat E, 15L 和 150L 发酵罐。15L 发酵罐中放入 10L 发酵液含蛋白脲 100g,酵母抽提粉 50g,少量无机盐及防泡剂,120 $^{\circ}$ C 灭菌 20min。冷却至 30 $^{\circ}$ C 加氨苄青霉素 0.5g,接种子液 250ml,灭菌葡萄糖液 40g,以 2mol/L NaOH/2mol/L HCl,调节维持 pH6.8~7.0,搅拌转速为 500r/min,温度 30 $^{\circ}$ C~42 $^{\circ}$ C,通气量 10L/min, PO₂ 50%。

2 结果和讨论

2.1 为了大规模生产鱼生长激素,构建常用的二种启动子, P_RP_L 及 Trp 质粒中皆含有氨苄青霉素抗性基因。

2.2 DNA 序列分析

鲤鱼生长激素重组 DNA 在 *E. coli* 中表达多一个甲硫氨酸,共 190 个氨基酸残基,分子中含有二硫键的多少与包涵体恢复天然结构关系密切,为了确切了解分子中是三对或二对二硫键,按材料及方法所述,进行 DNA 序列分析,结果列入图 1,表明鲤鱼生长激素分子中含有二对二硫键,但第 51 位氨基酸为丝氨酸不是半胱氨酸^[10]。

2.3 鱼生长激素工程菌的发酵

按材料及方法中所述,发酵过程中不断取样径 10000r/min 离心除上清,称量细胞湿重比较准确,一般测定发酵过程中的菌体浊度,由于使用的分光光度计型号不同,使用的光密度测定的波长不同,很难相比较。利用 P_RP_L 启动子经过 7h130 $^{\circ}$ C 发酵,转入 42 $^{\circ}$ C 诱导 4h,发酵即完成,10L 发酵液可得 1kg 以上湿菌种(见图 2,表 1)。

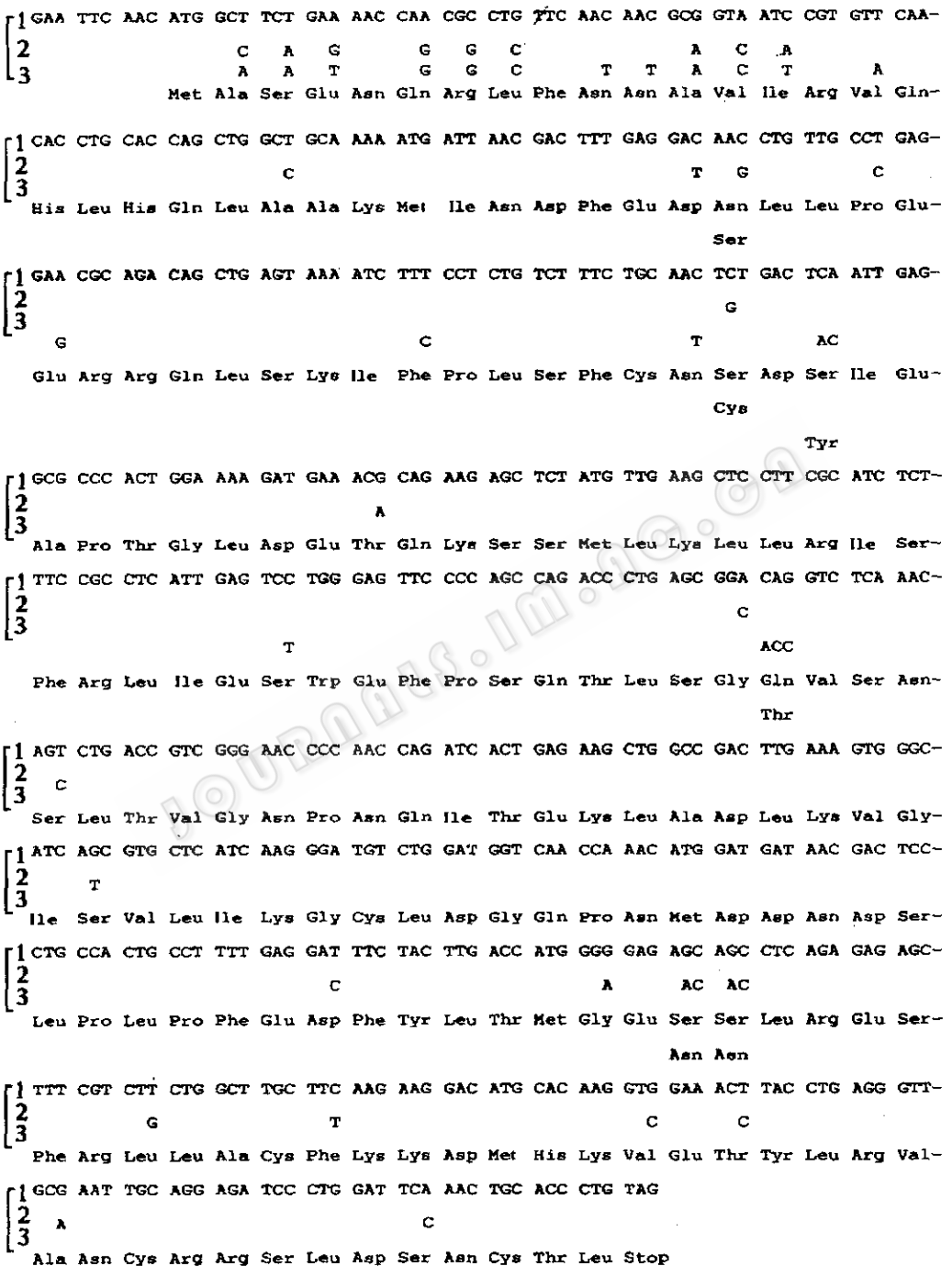


图 1 鲤鱼生长素的 DNA 及氨基酸序列

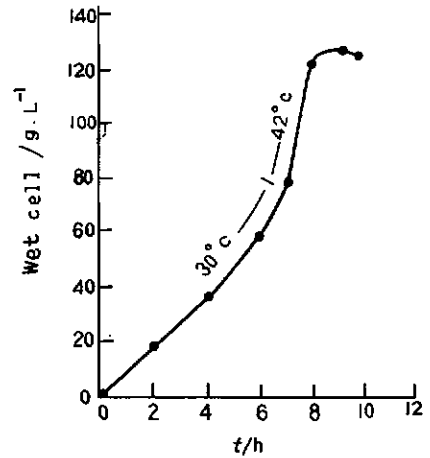
Fig. 1 The sequence of the cDNA and amino acid of the common carp fish growth hormone

1 Results of determining in this paper, 2 References [10], 3 Reference [15]

表 1 基因工程鲤鱼生长激素的生物活性测定

Table 1 Biological activity of the fish growth hormon

No. rat	Epiphyseal width of tibia in hypophysectomized/ μm	Average width/ μm	Stimulating activity/%
Control group	160, 165, 180 170, 175, 210	17.4	
Experimental group	180, 210, 280 270, 245, 215 155	23.6	34



2.4 后处理

发酵完毕,冷却至 30℃ 以下,以 Beckman J6B 离心机,4000r/min 离心 30min 收集菌体,将菌体移至塑料容器中,低温冻结、融化 2 次,破碎细胞,仍以 J6B 离心机,离心收集包涵体。

图 2 鲤鱼生长激素基因工程菌的发酵
Fig.2 Fermentation of the engineered bacteria *E. coli* harboring plasmid of fish growth hormone

用 8mol/L 尿素溶液 pH10.6, Gly-NaOH, 0.05mol/L 缓冲液抽提包涵体,离心除去不溶物,稀释 20 倍,在半胱氨酸存在 10℃ 以下,搅拌 20h,离心除去不溶物,超滤浓缩,冷冻干燥,得产品 20g,产品的 SDS-PAGE 分析如图 3 所示,分子量为 21000。

2.5 鱼生长激素生物活性测定

由中国科学院北京发育所进行,取二组除脑垂体大白鼠,一组作为对照,另一组注射鱼生长激素,结果如表 2,图 4 所示,具有生物活性。

表 2 基因工程鲤鱼生长激素的发酵生产

Table2 Scale-up of the production of fish growth hormone

Volume/L	Broth/L	Yield/g	
Saker	1	1.0	
	1	1.1	
	1	0.85	
Fermenter	15	10	
		10	21.2
		10	19.6
		100	210.5
	150	100	221.7
		100	200

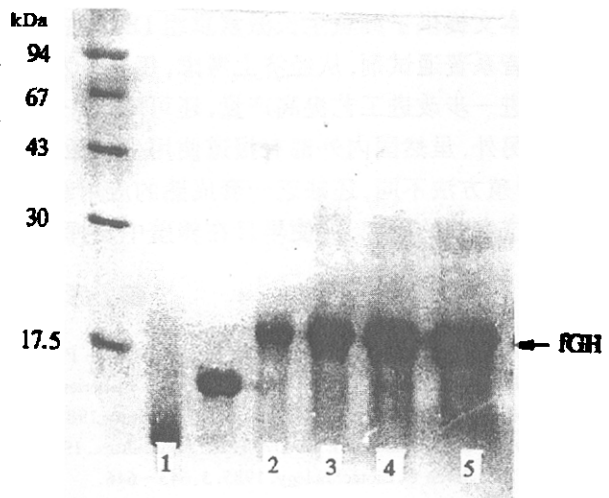


图 3 基因工程鲤鱼生长素的 SDS-PAGE 电泳图
Fig.3 Electrophoretogram of SDS-PAGE of the fish growth hormone

1. Stand protein, 2~5 Difference conc. of fish groth hormone

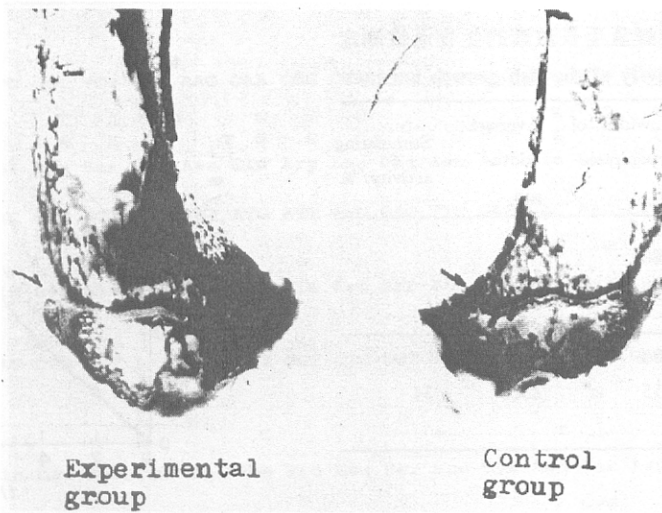


图 4 基因工程鲤鱼生长激素对去脑垂体幼大鼠胫骨生长的作用

Fig. 4 Epiphyseal width of tibia in hypophysectomized rat with common carp fish growth hormone

2.6 鱼生长激素对黑鲟鱼、对虾的作用

本实验由中国水产研究院上海东海水产研究所在上海郊区奉贤养殖场进行,共进行 1 年。获得重复性结果,对鱼苗、虾的浸渍可提高其存活率,饲料添加喂食促进生长获得增产效果。

3 讨 论

本文提供了鲤鱼生长激素重组 DNA 在大肠杆菌中表达的生产研究,工艺比较简单,所用皆系普通试剂,从经济上考虑,每立升发酵液获得 2g 产品,具有一定的使用价值。我们将进一步改进工艺提高产量,还可降低一些成本,尽量应用于名贵水产品种,如对虾养殖。另外,虽然国内外都有报道使用生长激素对水产养殖有增产效果,但各地气候条件不同,养殖方法不同,还缺乏一套成熟的应用经验,因此需要提高养殖技术,防病措施的配合继续这方面的研究,促使早日在养殖中发挥作用。

参 考 文 献

- [1] Downaldson E M, Fagerlund U H M, Higgs D A. *Fish Physiology Academic Press, New York, 1979, .8:455~479.*
- [2] Agellon L B, Emery O J, Jones J M. *Canadian J Fisheries and Aquatic Sciences, 1988, 45:146~151.*
- [3] Mclean E E, Downaldson M, Dye H M. *Aquaculture 1988, 68:145~155.*
- [4] Down N E, Downaldson E M, Dye H M. *Aquaculture, 1990, 91:191~203.*
- [5] Gill J A, Seven C. *Biotechnology, 1985, 3:643~646.*
- [6] Nerlz Y A, Tchelet A, Madar Z. *J Comparative Physiology B161: 159~163.*
- [7] Higgs D A, Downaldson E M, Mc Bride J R. *Canadian J Zoology, 1978, 56:1226~1231.*
- [8] Lebaill P Y, Sire M F, Vernier J M. *J Experimental Zoology, 1989, 251:101~107.*
- [9] Schulte P M, Down N E, Downaldson E M. *Aquaculture, 1989, 76:145~156.*
- [10] W. K. K. Ho, Tsang W H, Dias N P. *Biochem Biophy Res Comm, 1989, 161:1239~1243.*
- [11] Laemmli U K et al. *Nature, 1970, 227:680.*
- [12] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. *J Biol Chem, 1951, 193:265.*

- [13] Zhao Y J, Shi Z H, Kong H J. Proceedings on International Symposium on Shrimp Culture in Asia-pacific Region Sept. 16 ~ 20, 1993 Beijing, China pp. 160 ~ 162.
- [14] Tsai H J, Tseng C F, Kuo T T. Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica (Taiwan), 1993, 32: 162 ~ 176.
- [15] Show-Chyi Chao, FuMing Pan Wenchang Chang, Biochimica et Biophysica Acta. 1989, 1007: 233 ~ 236.

Study on the Production of Recombinant Common Carp Fish Somatotropin

Wu Aizhen Sun Yukun

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academy Sinica, Shanghai 200233)

Abstract The growth of shrimp or salmon could be accelerated by the artificial culture mixed with fish or bovin somatotropin. The production of recombinant fish somatotropin has great economic importance. This paper described the scale-up of the production of common carp fish somatotropin. It was expressed in *E. coli* by using P_{RPL} or Trp promotor. The inclusion body of the fish somatotropin was isolated from about 1.5kg wet cell of 10L fermentation broth and then through refolding and ultrafiltration 20g fish somatotropin was obtained. The Chinese shrimp immersed and feed additives with the recombinant fish somatotropin the survivor and the yield were increased.

Key words Recombinant fish somatotropin, production