

虹鳟生长激素 cDNA 在酵母中的表达*

马 进 白俊杰** 李新辉 罗建仁 简 清 张红军

(珠江水产研究所农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室 广州 510380)

摘 要 采用聚合酶链式反应(PCR)技术对虹鳟生长激素 cDNA 进行改造。将改造后的基因克隆到含酵母 PGK 启动子的大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pMA91, 转化酿酒酵母 Y33, 构建表达鱼生长激素的酵母工程菌 Y33(pMArGH16), 并在酵母中获得表达, 表达量约占细胞可溶性蛋白总量的 3%。表达产物作为饲料添加剂投喂罗非鱼, 具有明显的促进生长作用。

关键词 虹鳟生长激素 酵母 基因表达 口服 促生长

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0434-38

鱼生长激素 (fGH) 是由鱼脑垂体间叶细胞分泌的用于调节鱼体生长发育的一种多肽激素, 对鱼体具有高效促生长作用。不少研究证明, 基因重组的 fGH 与天然的 fGH 一样具有生物活性, 通过口服能被鱼体吸收^[1, 2], 具有很强的促生长作用^[3, 4]。酵母是单细胞真核生物, 不产生有毒产物, 又与原核生物一样易于培养和基因操作。利用酵母表达鱼类 GH, 再将酵母转化菌与饲料混合, 通过口服促进鱼类生长, 将是一种相当经济、方便、可大规模进行的途径。

本文采用聚合酶链式反应(PCR)方法, 对虹鳟生长激素 cDNA 进行改造和修饰, 构建 fGH 酵母工程菌, 并将酵母 Y33(pMArGH16) 作为饲料添加剂对罗非鱼进行促生长试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 虹鳟生长激素 cDNA 质粒 pRrGH 由中国科学院发育生物学研究所薛国雄研究员赠送, 质粒 pUC18 和大肠杆菌 DH5 α 购自华美生物工程公司, 大肠杆菌 C600 来自 Jacob and Monod Institute。含酵母和大肠杆菌复制起点的穿梭质粒 pMA91 来自广东省微生物所, 酿酒酵母 *S. cerevisiae* Y33 由复旦大学李育阳教授赠送。

1.1.2 工具酶和试剂: 限制酶、T4DNA 连接酶及其它试剂主要为 Promega 公司和华美生物工程公司产品。PCR 扩增试剂盒 B 购自华美生物工程公司。

1.1.3 实验鱼和水族箱: 实验用罗非鱼平均体重 3.2g, 取自本所水产良种基地。水族箱规格为 80 \times 60 \times 50 (cm³)。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 制备、大肠杆菌转化、低熔点琼脂糖回收 DNA、SDS-PAGE 等方法参照

* 农业部“九五”渔业科技重点项目(No. 95-B-96-02-02-04), 中国水产科学研究院基金资助(No. 95-08-01)

** 联系作者。

Sambrook 的方法^[5]。酵母完整细胞转化按毛小洪等的方法进行^[6]。

1.2.2 PCR 扩增及扩增产物的克隆和序列分析：扩增引物委托上海 Sangon 生物工程有限公司合成,合成产物经 PAGE 纯化。PCR 反应在 Perkin Ectus 2400 型 DNA 扩增仪上进行。模板浓度 10ng,引物浓度 25pmol。解链反应 94℃,60s;退火反应 55℃,60s;延伸反应 72℃,90s;反应总体积 50 μ L,25 个循环。PCR 扩增产物经 *Bam*HI 酶切消化与 *Bam*HI 酶切消化的 pUC18 DNA 混合, T4DNA 连接酶连接过夜,转化 DH5 α ,电泳法和酶切法筛选重组子。序列分析在 ABIPRISM TM 377 全自动荧光测序仪上进行。

1.2.3 虹鳟 GH cDNA 酵母表达质粒的构建与检测：*Bam*HI 酶切 pUrGH9,低熔点琼脂糖回收目的片段,与 *Bgl*II 酶切的 pMA91 DNA 混合, T4DNA 连接酶 14℃ 过夜连接,转化 *E. coli* C600,用电泳法和酶切法筛选重组子, *Sal*I 酶切确定正向插入的重组子。完整酵母细胞转化法转化酿酒酵母 Y33,构建 fGH 酵母表达菌 Y33(pMArGH16)。

1.2.4 重组 fGH 的检测：收集 YPD 培养的酵母菌 Y33(pMArGH16),用蜗牛酶去细胞壁,制成原生质体,超声波破碎细胞,离心取上清液,按 Sambrook 的方法^[5]进行 SDS-PAGE 检测和用特异性兔抗鱼生长激素抗体进行放射免疫测定。

1.2.5 重组 fGH 促进罗非鱼生长实验：42 尾 4~5cm 的罗非鱼随机分成两组放入 80 \times 60 \times 50cm³ 的水族箱中,实验时间从 1998 年 8 月 4 日到 1998 年 9 月 28 日,实验水温恒定 25℃。每天换一次水,投喂鳊鱼饲料,喂饱为止。实验组在每克饲料中加入 20mg 酵母菌 Y33(pMArGH16),对照组在每克饲料中加入 20mg 酵母菌 Y33(pMA91)。每周测体重、体长 1 次, *t*-检验统计分析数据($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

1.2.6 重组质粒稳定性检测：参考 Kim 的方法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 虹鳟 GH cDNA 的改造和克隆

为了扩增适合酵母表达的虹鳟生长激素成熟肽编码序列,我们设计了 2 种引物

P1 5'CGCGGATCCATGATGGAAAACCAACGGCTCT3'

P2 5'CGCGGATCCACGTTTACAGAGTGCAGTTG 3'

P1 是 5' 端引物,含 31 个碱基,在编码虹鳟 GH 成熟肽序列第一个密码子前加入了一个起始密码子 ATG,一个 *Bam*HI 识别位点。P2 是终止引物,29 个碱基,也引入了一个 *Bam*HI 酶切位点。用 P1、P2 做引物,含虹鳟生长激素 cDNA 质粒 pRrGH 为模板,经 PCR 扩增得到一个约 590bp 的扩增片段(图 1)。(由于 DNA 样品浓度过高,在电泳过程中酶切片段分离不好,影响电泳效果,因此图 1 中 pUrGH9 的插入片段在酶切电泳图中比 PCR 扩增产物看起来略偏大)。扩增片段克隆到 pUC18 中得到重组子 pUrGH9。取 pUrGH9 进行序列测定,测序结果表明修饰后的虹鳟 GH cDNA 完全符合设计要求。

2.2 虹鳟 GH 酵母表达载体的构建

用 *Bam*HI 酶切 pUrGH9,回收目的片段,插入 pMA91,转化 *E. coli* C600,用电泳法和酶切法筛选重组子,重组质粒经 *Hin*dIII 酶切证实有插入片段(图 2)。用 *Sal*I 酶切验证插入的方向(酶切图未显示)。将正向插入的重组子命名为 pMArGH16。pMArGH16 的构建示意图见图 3。

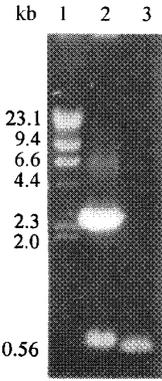


图 1 PCR 产物及 pUrGH9 酶切的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR products and restriction mapping of pUrGH9

- 1.λDNA/*Hind*III ;
- 2. pUrGH9/*Bam* HI ;
- 3. PCR products

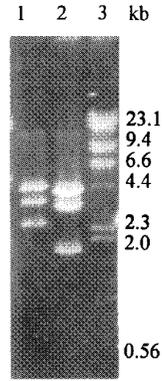


图 2 pMArGH16 的酶切电泳图

Fig.2 Restriction mapping of pMArGH16

- 1. pMArGH16/*Hind*III
- 2. pMA91/*Hind*III
- 3. λDNA/*Hind*III

2.3 酵母的转化和检测

用完整细胞转化法将质粒 pMA91 及 pMArGH16 转入酿酒酵母 Y33 ,在缺亮氨酸的 YNB 培养基上筛选出含质粒 pMArGH16 的酵母 Y33 (pMArGH16),该菌株经 30℃ 培养 24h 后 ,破碎细胞取上清液进行 SDS-PAGE 分析和特异性鱼生长激素抗体放射性免疫活性测定。SDS-PAGE 结果表明 pMArGH16 酵母菌株在分子量约 22kD 处有一条特异蛋白带 经扫描测得特异蛋白约占细胞可溶蛋白的 3%。空载体 pMA91 酵母菌株没有出现这种特异性蛋白带 (图 4)。用兔抗鲤鱼 GH 抗血清进行放射性免疫活性测定 ,结果显示其

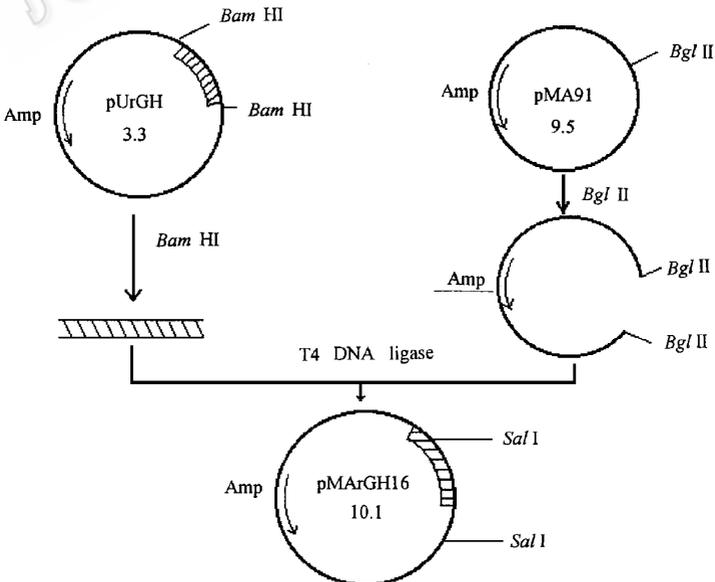


图 3 质粒 pMArGH16 的构建

Fig.3 Construction of pMArGH16

特异性放射免疫与对照的 pMA91 菌株有显著性差异。由于虹鳟 GH 和鲤鱼 GH 的同源性只有 60% ,放射免疫的结果无法测出样品中 GH 活性物质的含量。

2.4 重组质粒 pMArGH16 在酿酒酵母中的稳定性

挑取酿酒酵母 Y33(pMArGH16)单菌落 ,接种于 YPD 液体培养基中 ,30℃ 振荡培养 5d 后 ,取样涂 YPD 平板 ,分离单菌落 ,分别接种于亮氨酸缺陷的 SC 选择培养基和 YPD 完全培养基上 ,30℃ 培养 2d ,在 YPD 培养基上生长而在 SC 培养基上不能生长者即为丢失质粒的转化子。表 1 的结果表明 ,在无选择压力的情况下 ,连续培养 5d ,重组质粒 pMArGH16 的丢失率只有 4.4% ,表明它能在酿酒酵母中稳定地存在。

2.5 含重组 GH 的酵母对罗非鱼生长的促进作用

试验鱼在 7 周的投喂期间成活率为 100% ,实验的测量数据见表 2。经 7 周实验 ,实验鱼的体长和体重均与对照组有显著差异。实验鱼的体长和体重增长率分别比对照组快 22.9% 和 38%。证明酵母 Y33(pMArGH16)胞内表达的鱼生长激素具有生物活性 ,fGH 这种大分子蛋白质可以通过口服被罗非鱼肠道吸收 ,进入血液循环系统 ,从而有较强的促进罗非鱼生长的作用。

表 1 重组质粒 pMArGH 在酵母 Y33 中的稳定性

Table 1 Stability of recombinant plasmid pMArGH16 in Y33

Transformant	Number of Colonies in YPD	Number of colonies not grown in SC	Missing rate /%
Y33(pMArGH16)	452	20	4.4

表 2 口服基因重组 fGH 对罗非鱼的促生长作用

Table 2 Effects on growth of Tilapia fingerling by feeding the recombinant fGH

Time /Week	Test		Control	
	Boby length/cm	Body weight/g	Boby length/cm	Body weight/g
0	4.5 ± 0.12	3.20 ± 0.36	4.48 ± 0.13	3.14 ± 0.32
1	4.82 ± 0.18	4.41 ± 0.56	4.81 ± 0.17	4.26 ± 0.20
2	5.35 ± 0.26	5.68 ± 0.86	5.29 ± 0.26	5.33 ± 0.66
3	6.11 ± 0.36	8.63 ± 1.64	5.99 ± 0.38	8.03 ± 1.40
4	6.65 ± 0.39	10.42 ± 2.28	6.42 ± 0.47	9.47 ± 1.87
5	7.26 ± 0.47	14.30 ± 2.95*	7.06 ± 0.42	12.50 ± 2.29
6	7.69 ± 0.53*	16.44 ± 3.58*	7.35 ± 0.46	13.89 ± 2.72
7	8.48 ± 0.67**	20.31 ± 4.88**	7.71 ± 0.55	15.50 ± 3.25

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

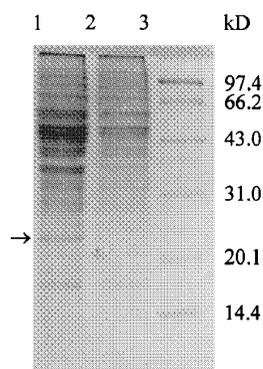


图 4 Y33(pMArGH16)表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of pMArGH16 expression products in Y33

1. Protein of Y33(pMArGH16);
2. Protein of Y33(pMA91);
3. Protein marker

在酵母细胞内表达鱼生长激素作为鱼生长促进剂,可免去基因工程下游提取、纯化工作,又充分利用了酵母这一蛋白源。质粒 pMArGH16 在酵母中不需诱导即可表达,并有一定的稳定性,有利于工业化生产。虹鳟生长激素 cDNA 在酵母中的成功表达为新型、高效鱼类饲料添加剂的开发奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] U. Georgopoulou, U. H. M. Fagerlund, D. A. Higgs *et al.* *Cell Tissue Res*, 1986, **245**: 387~395.
 [2] P. Y. LeBail, M. F. Sire, J. M. Vernier *et al.* *Zool*, 1989, **251**: 101~107.
 [3] J. A. Gill, J. P. Sumter, E. M. Donaldson *et al.* *Bio/Technology*, 1985, **3**: 643~646.
 [4] E. Mclean, E. M. Donaldson, H. M. Dye *et al.* *Aquaculture*, 1990, **91**: 197~203.
 [5] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *et al.* *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2nd ed), Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.
 [6] 毛小洪, 蔡金科. *生物工程学报*, 1990, **6**(2): 102~107.
 [7] K. Kim. *Appl. Environment Microbiol*, 1988, **54**: 966.

Expression of Rainbow Trout Growth Hormone cDNA in Yeast *Saccharomyces cerevisiae**

Ma Jin Bai Junjie Li Xinhui Luo Jianren Jian Qing Zhang Hongjun
 (Key Lab. of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture,
 Pear River Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380)

Abstract Rainbow trout growth hormone cDNA was modified by PCR. Then the cDNA was subcloned into the expression vector pMA91 and transformed into yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y33 to construct an expression strain Y33(pMArGH16). The recombinant gene could highly express the growth hormone peptide (about 3% of the total proteins) in Y33 (pMArGH16). The expression product was used as a supplement to feed Tilapia fingerling. The result showed that the recombinant fish GH has notable growth enhancement to Tilapia fingerling.

Key words Rainbow trout growth hormone gene expression in yeast, take orally, growth enhancement