

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 15/18

C12N 15/81

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97109295.8

[43]公开日 1999年5月12日

[11]公开号 CN 1216320A

[22]申请日 97.11.5 [21]申请号 97109295.8

[71]申请人 中国科学院水生生物研究所

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山

共同申请人 吴石君

[72]发明人 朱作言 吴石君 汪亚平 刘汉勤

[74]专利代理机构 中国科学院武汉专利事务所

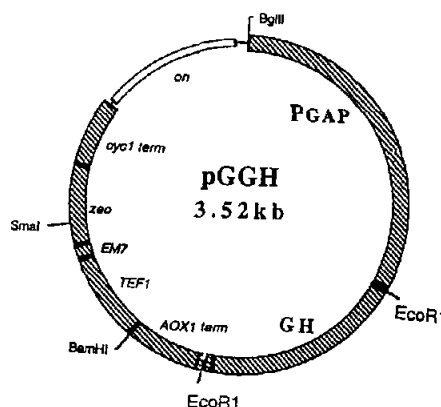
代理人 刘鑫洲

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 利用合成基因在酵母菌中生产草鱼生长激素的方法

[57]摘要

根据天然草鱼生长激素多肽的氨基酸顺序,设计了适合其在酵母表达的 DNA 编码顺序,采用 PCR 技术完成了草鱼生长激素基因人工合成。在此基础上,将此基因克隆在酵母基因表达系统,使之与酵母染色体 DNA 整合,并筛选高 基因拷贝和高表达的酵母株。该菌株表达的草鱼生长激素占酵母细胞总蛋白的 12%,经氨基酸顺序分析表明酵母所生产的草鱼生长激素多肽与天然多肽相同,该基因表达水平持续稳定,可应用于渔业和提高水产养殖效益。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1、一种利用合成基因在酵母菌中生产草鱼生长激素的方法，其特征是：

A、16个寡聚脱氧核糖核酸的顺序，其中8个为正向顺序，另8个为“搭桥”反向顺序，该基因5'端和3'端分别附有EcoR 1酶切位点；

B、人工合成的草鱼生长激素基因克隆在表达载体pGAPZA中，构成重组质粒pGGH DNA；

C、用电脉冲方法将pGGH DNA导入酵母宿主细胞并使之与染色质整合；

D、筛选高拷贝整合和高表达的酵母菌转化株。

说明书

利用合成基因在酵母菌中生产草鱼生长激素的方法

本发明涉及养鱼业，特别涉及利用酵母菌大量生产淡水鱼生长激素和将其用于鱼类养殖的方法。

淡水养殖在我国水产业中占有重要位置。以配合饲料进行集约化养殖代替自然放养已获得明显的经济效益，并已成为水产养殖的发展趋势。为提高养殖鱼类的生长速度和产量，高蛋白含量的鱼粉、动物血粉、植物蛋白等已广泛用于配合饲料生产，而类固醇类激素也已用于饲料添加剂以促进鱼类生长（美国专利#4,210,634,1980）。但由于类固醇类激素在鱼代谢中不易被降解，可能在被食用后引入人体，因而引起人们忧虑。

多肽生长激素具有调节和促进生长的作用，是脊椎动物（包括鱼类）体内固有的成分，并可在动物体内自动降解而不影响人类食用。多种有经济价值的海鱼生长激素基因已被克隆，我们克隆了生长最快的淡水养殖鱼草鱼的生长激素基因（Zhu et al, 1992. Eur. J. Biochem. 206. 643-648）。已有报道，用含有虹鳟生长激素的酵母饲喂幼鱼后，幼鱼生长加快，无论体重和体长都大于对照鱼（Tsai et al, 1994. The Progressive Fish-culturist, 56, 7-12）。我们的初步研究发现，用草鱼生长激素直接浸泡鱼苗，亦可促进其生长。但至今尚未有用酵母生产淡水鱼类生长激素和将其用于鱼类养殖的报道和专利。

南韩Lucky Ltd 公司Cho等人的专利（美国的专利#5,270,180,1993）叙述了用合成基因在酵母中生产鲑鱼生长激素，鲑鱼生长激素含量可达50 mg/l 培养物（OD₅₅₀=15），比相应DNA重组基因在酵母中的表达水平明显提高。但由于鲑鱼生长激素分子与淡水鱼的差异较大，影响在淡水鱼养殖上的应用。

本发明的目的是合成草鱼生长激素基因，并在酵母菌中高效表达，大量生产草鱼生长激素，以用于淡水渔业和提高其生产效益。

技术方案：

根据天然草鱼生长激素多肽的氨基酸顺序，设计适合在酵母菌表达的该基因的DNA编码顺序。为此，首先合成一系列的寡聚脱氧核糖核酸，采用多聚酶链式反应（PCR）技术进行草鱼生长激素基因人工合成。在此基础上，将此基因克隆在酵母基因表达系统，使之与酵母染色质DNA整合，并筛选高基因拷贝和高表达的酵母株。提取其总蛋白，经聚丙烯酰胺凝胶电泳和染色扫描后，分析草鱼生长激素占酵母细胞总蛋白的量。经氨基酸顺序分析，测酵母菌

株生产的草鱼生长激素多肽与天然多肽的一致性。经多代培养鉴定，测该基因表达水平的稳定性。

有益效果：

- 1、草鱼生长激素基因表达产物占酵母菌总蛋白的12%，其中50-60为水溶性蛋白；
- 2、酵母菌生产的草鱼生长激素多肽与天然多肽相同；
- 3、经50代培养鉴定，该基因表达水平持续稳定；
- 4、将含有合成草鱼生长激素的酵母作鱼饲料添加剂喂幼鱼，或用其它方法处理鱼苗，能促进其生长，提高水产养殖效益。

附图1：根据天然草鱼生长激素基因氨基酸顺序，合成16个寡聚脱氧核糖核酸；

附图2：16个寡聚脱氧核糖核酸在合成基因中的位置及两端的EcoRI酶切位点；

附图3：合成的草鱼生长激素基因DNA顺序及相应氨基酸顺序；

附图4：用于在酵母表达的草鱼生长激素基因重组质粒pGGH。PGAP为Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase基因启动子，GH为草鱼生长激素合成基因；

附图5：草鱼生长激素合成基因表达产物的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

“1”和“4”为蛋白分子量，“2”为未克隆基因的载体质粒转化酵母的蛋白提取物，“3”为合成基因重组质粒转化酵母的蛋白提取物，箭头标示生长激素区带。

方法与步骤：

1、根据天然草鱼生长激素合成的16个寡聚脱氧核糖核酸的顺序见图1。其中8个为正向顺序，另8个为“搭桥”反向顺序，该基因5'端和3'端分别附有EcoRI酶切位点，见图2。

2、进行PCR反应的100 μ l溶液中含上述16个寡聚脱氧核糖核酸各5 μ mol，dATP，dCTP，dGTP和dTTP各0.5 μ mol，Tris-HCl(pH9.3)25 μ mol，KCl50 μ mol，MgCl₂2 μ mol， β -巯基乙醇1 μ mol，Taq DNA聚合酶2.5单位。

PCR反应在Perkin-Elmer2400型反应器进行，反应为30周期，每周程序是95 $^{\circ}$ C 0.5分钟，55 $^{\circ}$ C 0.5分钟，74 $^{\circ}$ C 1分钟。PCR产物克隆在pGEM-T载体上，并测定合成基因的DNA顺序，见图3。

3、合成生长激素基因DNA经EcoR 1消化后，与预先经EcoR 1消化的表达载体pGAPZA (Invitrogen Inc.) DNA连接(14℃16h)。连接后的DNA转化大肠杆菌，并大量制备重组基因pGGH DNA，见图4。

4、用Invitrogen Inc. II型电脉冲仪将pGGH DNA导入酵母宿主细胞，用含Zeocin的YPD培养基筛选，获得高拷贝转化株。YPD培养基组成为1%酵母提取物，2%水解干酪素，2%D-葡萄糖。Zeocin为Invitrogen Inc. 产品，筛选使用浓度为100、500、1000、2000和3000 μg/ml。

5、含拷贝pGGH基因酵母转化株经Southern blot, Northern blot鉴定后，在YD培养基(1%酵母提取物，0.5%D-葡萄糖)、30℃震荡培养，并于24、48、72和96小时取样检查草鱼生长激素表达产物的产量。

6、用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质区带转移技术，以免抗草鱼生长激素IgG鉴定表达产物。结果表明，草鱼生长激素基因表达产物占酵母菌总蛋白的12%左右，其中50-60-为水溶性蛋白，见图5。

圖 三 說 明

- G1: AGAATTTCATG TCTGAGAACC AACGTCPTTT CAACAACGCT GTCATCCGTG TTCAACAC (58mer)
- G2: GCTGCTAAGA TGAATTAACGA CTTGAGAGAC AACCTGTTGC CAGAGGAAAG AAG (53mer)
- G3: TTCCCACTGT CTTTCTGTAA CTCGTACTCT ATTGAGGCTC CAACTGGTAA G (51mer)
- G4: CTCTATGTTG AAGCTTCTTA GAATCTCTTT CAGACTTATT GAGTCTGGG AGTTCACAAA (60mer)
- G5: CTGTCTTAA CTCTCTGACC GTCGGTAACC CAAACAGAT CACTGAGAA G CTG (53mer)
- G6: GTATCTCCGT TCTTATCAAG GGTGTCTGG ACGGTC AACCATGGAT GATTAAC (56mer)
- G7: GAGGACTTCT ACTTGACCAT GGGTGAATCC TCCCTTCGTG AGTCCCTCAG ACTTCTG (57mer)
- G8: GAAGGACATG CACAAGTTG AAACCTTACC GAGAGTTGCT AACTGTAGAA GATCCCTG (58mer)
- H1: GTTAATCATC TTAGCAGCCA GTTGGTGCAG GTGTGAACA CGGATGACAG (50mer)
- H2: GTTACAGAAA GACAGTGGGA AGATTTTAGA AAGTTGTCTT CTTTCCCTCTG GCNACAG (57mer)
- H3: GAAGCTTCAA CATTAGAGGAC TTTTGGGCTT CGTCCCTTACC AGTTGAGCC TCAAT (55mer)
- H4: GGTCAGAGAG TTAGAGACAG CACCGACAG GGTTTGGAT GGGAACTCCC AG (52mer)
- H5: CCTGATAAG AACGAGATA CCAACCTTCA AGTCGGCCAG CTTCACAGTG ATCTG (55mer)
- H6: GTCAAAGTAG AGTCCCTCAA AGGTGGTGGC AGGAGTCTGT TATCATCCAT GTTTGGTTG (59mer)
- H7: GTTCAACCT TGTGCATGTC CTTCCTGAAA CAAGCCAGAA GTCTGAAGGA CTCAC (55mer)
- H8: GAATTCCTTAC AGGCTACAGT TAGAATCCAG GGATCTTCTA CAGTTAG (47mer)



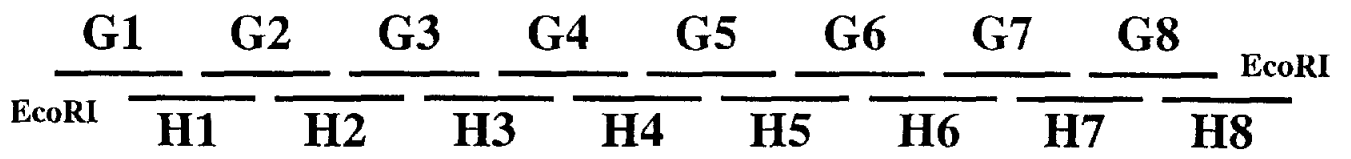


图 2

```

TCTGAGAACCAACGTCTTTCAACAACGCTGTCATCCGTGTCAACACCTGCACCAACTG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
AGACTCTTGGTTGCAGAAAAGTTGTTGCGACAGTAGGCACAAGTTGTGGACGTGGTTGAC
a: SerGluAsnGlnArgLeuPheAsnAsnAlaValIleArgValGlnHisLeuHisGlnLeu -
GCTGCTAAGATGATTAACGACTTCGAGGACAACCTGTGCCAGAGGAAAGAAGACAACCTT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CGACGATTCTACTAATTGCTGAAGCTCCTGTTGGACAACGGTCTCCTTTCTTCTGTTGAA
a: AlaAlaLysMetIleAsnAspPheGluAspAsnLeuLeuProGluGluArgArgGlnLeu -
TCTAAAATCTTCCCCTGTCTTTCTGTAACCTGACTCTATTGAGGCTCCAACCTGGTAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGATTTTGAAGGGTGACAGAAAGACATTGAGACTGAGATAACTCCGAGGTTGACCATTC
a: SerLysIlePheProLeuSerPheCysAsnSerAspSerIleGluAlaProThrGlyLys -
GACGAGACCCAAAAGTCTCTATGTTGAAGCTTCTTAGAATCTCTTTCAGACTTATTGAG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CTGCTCTGGGTTTTTCAGGAGATACAACCTCGAAGAATCTTAGAGAAAGTCTGAATAACTC
a: AspGluThrGlnLysSerSerMetLeuLysLeuLeuArgIleSerPheArgLeuIleGlu -
TCCTGGGAGTTCCCATCCCAAACCTGTCCGGTGTCTCTAACTCTCTGACCGTCCGGT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
AGGACCCTCAAGGGTAGGGTTTGGGACAGGCCACGACAGAGATTGAGAGACTGGCAGCCA
a: SerTrpGluPheProSerGlnThrLeuSerGlyAlaValSerAsnSerLeuThrValGly -
AACCCAAACCAGATCACTGAGAAGCTGGCCGACTTGAAGGTTGGTATCTCCGTTCTTATC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTGGGTTTGGTCTAGTACTCTTCGACCGGCTGAACTTCCAACCATAGAGGCAAGAATAG
a: AsnProAsnGlnIleThrGluLysLeuAlaAspLeuLysValGlyIleSerValLeuIle -
AAGGGTTGTCTGGACGGTCAACCAAACATGGATGATAACGACTCCCTGCCACCACCTTTG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TTCCCAACAGACCTGCCAGTTGGTTTGTACCTACTATTGCTGAGGGACGGTGGTGGAAAC
a: LysGlyCysLeuAspGlyGlnProAsnMetAspAspAsnAspSerLeuProProProLeu -
GAGGACTTCTACTTGACCATGGGTGAGTCCTCCCTTCGTGAGTCCTTCAGACTTCTGGCT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CTCCTGAAGATGAACTGGTACCCACTCAGGAGGGAAGCACTCAGGAAGTCTGAAGACCGA
a: GluAspPheTyrLeuThrMetGlyGluSerSerLeuArgGluSerPheArgLeuLeuAla -
TGTTTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTTGAAACTTACCTGAGAGTTGCTAACTGTAGAAGA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ACAAAGTTCTTCTGTACGTGTTCCAACCTTGAATGGACTCTCAACGATTGACATCTTCT
a: CysPheLysLysAspMetHisLysValGluThrTyrLeuArgValAlaAsnCysArgArg -
TCCCTGGATTCTAACTGTACCCTGTAA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 567
AGGGACCTAAGATTGACATGGGACATT
a: SerLeuAspSerAsnCysThiLeuEnd

```

图 3

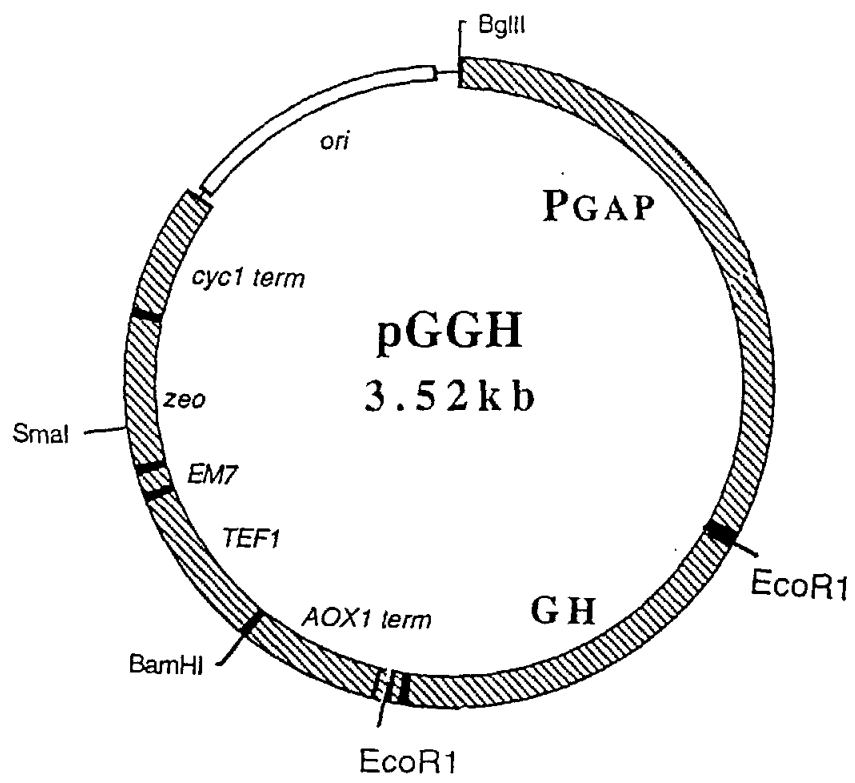


图 4

1 2 3 4

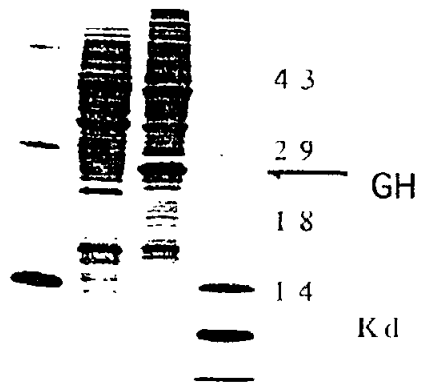


图 5