

鲤生长激素酵母工程菌的分泌表达和产物纯化

李英华^{1,2}, 白俊杰¹, 简清¹, 叶星¹, 李新辉¹, 罗建仁¹, 梁旭方²

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带鱼类选育与

养殖重点开放实验室, 广东广州 510380;

2. 暨南大学生命科学技术学院, 生物工程系, 广东广州 510632)

摘 要: 取本室构建的鲤生长激素毕赤酵母工程菌 GS115(pPICZaA-GH), 甲醇诱导, SDS-PAGE 检测, 证明重组鲤生长激素(Recombinant Carp Growth Hormone, rcGH)在酵母中得到分泌表达。重组酵母菌生长曲线显示, 细胞从培养第8小时进入对数生长期, 至32 h OD₆₀₀升至峰值11.5, 此后OD₆₀₀缓慢下降。在以100%甲醇按0.5%添加量诱导至72 h, pH为6.0时, rcGH表达量最高。凝胶扫描分析, 分泌表达的rcGH占上清总蛋白的36.41%, 表达量为300~400 mg/L发酵液。经离子交换层析法纯化表达产物, 纯度可达95%。纯化的rcGH注射奥尼罗非鱼, 结果表明具有明显的促生长作用。

关键词: 毕赤酵母; 鲤生长激素; 分泌表达; 纯化; 促生长

中图分类号: Q575.11

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)04-0289-04

鱼生长激素(GH)是鱼脑垂体合成并分泌的一种单链多肽激素, 参与鱼体生长、发育、代谢和生殖等基本生理活动, 是鱼类最重要的生长调节因子^[1]。水产养殖业可利用外源GH, 特别是鱼类的GH来达到提高产量的目的^[2]。鱼体中GH含量甚微, 从脑垂体中提取难度大、且成本高, 这使得GH的生物学效应研究以及鱼类放射免疫检测、放射受体检测和ELISA方法的建立受到限制。基因工程为生产大量鱼生长激素提供了条件。

目前国内外有不少重组鱼GH的研究, 已经有十多种鱼的GH在微生物中得到了表达^[3]。国内陈丹等^[4]在毕赤酵母胞内表达了鲈GH, 我们也先后用酿酒酵母和毕赤酵母胞内表达了有生物活性的鱼GH, 这2种重组酵母用作饲料添加剂对罗非鱼都有明显的促生长效果^[5-6]。由于胞内表达产物受到

细胞蛋白的干扰, 给基因工程下游纯化工作带来不便。为了得到高纯度的重组GH, 促进鱼类GH的进一步研究和应用, 本研究采用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统分泌表达并纯化了具有生物活性的重组鲤生长激素(rcGH)。

1 材料与方法

1.1 材料

鲤生长激素毕赤酵母工程菌 GS115(pPICZaA-GH)由本室构建。标准鲤GH系本室从大肠杆菌工程菌中制备并保存^[7]。抗菌素 Zeocin 为 Invitrogen 公司产品。其他主要试剂为 Promega 公司和华美生物工程公司产品。实验用奥尼罗非鱼鱼种取自珠江水产研究所水产良种基地。层析设备为安发玛西亚公司生产的 AKTA Prime 系统。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 YPD、BMGY 等培养基按美国 Invitrogen 公司 *Pichia* Expression kit 手册中介绍的方法配制。

1.2.2 重组酵母菌的生长曲线 将活化的重组酵母菌按1:40的量接种于pH 6.0的BMGY液体培养基中, 每间隔4 h取1次样, 测OD₆₀₀。

收稿日期: 2002-04-04.

基金项目: 农业部“九五”渔业科技重点项目(95-B-96-02-02-04); 中国水产科学研究院重点基金项目(99-08-02).

作者简介: 李英华(1975-), 女, 硕士, 现为中科院遗传所2001级博士, 主要从事基因组学方面研究。

通讯作者: 白俊杰, Tel: 020-81616127. E-mail: jjbai@163.net

1.2.3 rcGH 在不同时间的表达

(1)工程菌活化和培养 分别接种单克隆重组酵母菌株 GS115 (pPICZαA - GH) 和对照菌株 GS115(pPICZαA)于 3 mL 含有 100 μg/mL Zeocin 的 YPD 抗性培养基中。28 ~ 30 ℃, 200 ~ 300 r/min, 摇床培养过夜。各取 0.5 mL 过夜培养物转接入 20 mL BMGY 甘油培养基, 同上摇床培养, 至细胞生长至对数生长期。

(2)诱导表达和电泳检测 甲醇诱导处于对数生长期的细胞, 每 24 h 按 0.5% 的量添加 100% 的甲醇进行诱导。连续诱导 4 d, 每间隔 24 h 取 1 次样, 5 000 ~ 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, SDS - PAGE 检测。

1.2.4 pH 对 rcGH 表达量的影响 用 0.5 mol/L 的 H₂SO₄ 调节培养基的酸碱度, 设置 pH 梯度为 4.5, 5.5, 6.0, 6.5。按 1.2.3 方法进行培养和诱导, 甲醇诱导 72 h 后, 电泳检测。电泳条带在 Tiger gel 凝胶图象分析仪上作定量分析。

1.2.5 离子交换层析纯化表达产物 发酵上清液在 0.05 mol/L, pH 9.0 的 Tris - Cl 缓冲液 A 中透析过夜。用缓冲液 A 平衡 Q - Sepharose FF 预装柱, 上样后, 用缓冲液 A 和缓冲液 B (缓冲液 A + 1 mol/L NaCl) 进行连续梯度洗脱, 分部收集洗脱峰, SDS - PAGE 检测。

1.2.6 rcGH 促进罗非鱼生长实验 60 尾体长 8.0 ~ 9.0 cm 的奥尼罗非鱼随机分 3 组放入 80 cm × 60 cm × 50 cm 的水族箱中, 每箱 20 尾。实验时间从 2001 年 4 月 3 日到 2001 年 5 月 18 日。每天换 1 次水, 投喂 1 次鳊鱼饲料, 投喂量为鱼体重的 3%。将纯化的 rcGH 透析除盐, 冷冻干燥成粉, 溶解在 0.75% 灭菌的生理盐水中, 每周腹腔注射罗非鱼 1 次。实验组 1 和 2 注射剂量分别为 0.1 和 1 μg/(g 体重·周), 对照组注射等量的生理盐水。每周测量体重、体长 1 次, *t* - 检验统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 重组酵母菌的生长曲线

图 1 为重组酵母菌的生长曲线。生长曲线显示, 在培养前的 8 h 细胞处于潜伏期, OD₆₀₀ 几乎没有变化。从第 8 小时开始, 进入对数生长期, 到 32 h 时 OD₆₀₀ 升至最高值, 约为 11.5, 此后, 细胞生长进入平台期和衰老期, OD₆₀₀ 开始缓慢下降。

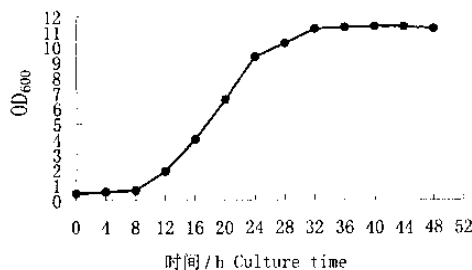


图 1 GS115 (pPICZαA - GH) 的生长曲线

Fig. 1 Growth phase of GS115 (pPICZαA - GH)

2.2 诱导时间对表达量的影响

取 5 μL 发酵上清, 15% 胶浓度的 SDS - PAGE 检测。结果见图 2, 在诱导 24 h, 已有 rcGH 表达, 72 h 表达量最高, 96 h 表达量稍有下降。

2.3 pH 对表达量的影响

甲醇诱导 72 h 后, 取样 5 μL, SDS - PAGE 检测。结果见图 3, 在 pH 6.0 时, GH 表达量最高, 表达量为 300 ~ 400 mg/L。pH 5.5 和 6.5 时次之, pH 4.5 时几乎检测不到 GH。说明 pH 对鲤 GH 的表达影响比较大。

2.4 凝胶薄层扫描分析

对图 3 中的第 4 条泳道在 Tiger gel 凝胶图象分析仪进行扫描分析, 分析报告见图 4。其中第 9 个峰(A9)为 rcGH 所在峰, 积分结果表明, 表达的 rcGH 占培养基上清总蛋白的 36.41%。

2.5 表达产物的纯化

50 mL 发酵上清透析后, 上预装柱层析, 用缓冲液 A 和 B 作梯度洗脱, 自动分部收集洗脱液。SDS - PAGE 检测收集样品, 洗脱曲线见图 5, 第 3 个峰为 GH 的洗脱峰。纯化 GH 见图 2 泳道 7。

2.6 促生长作用

实验期间 3 组鱼的成活率均为 100%。实验数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示 (表 1)。实验结束时, 实验组 1、2 与对照组相比, 体长增长率分别高 10.05% 和 17.09%, 体重增长率分别高 22.13% 和 39.10%。*t* 检验分析, 与对照相比, 实验组 1 鱼体长增长差异不显著, 体重在第 4 周开始有显著增长, 实验结束时达到极显著水平。实验组 2 体长在第 6 周有显著增长, 体重在第 3 周开始有显著增长, 第 5 周达到极显著水平。结果表明, 纯化的 rcGH 有明显促进罗非鱼生长的作用。

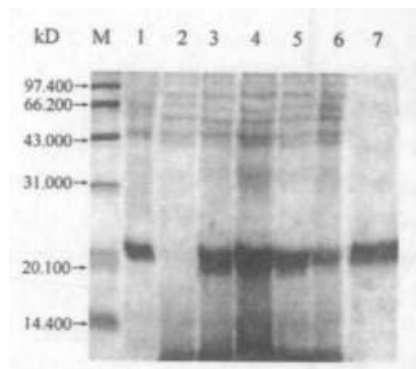


图2 rcGH在不同诱导时间的表达

Fig. 2 Expressions of rcGH at different time points

M—蛋白; 1. 标准鲤 GH; 2. GS115 (pPICZaA); 3~6. GS115 (pPICZaA-GH) 分别诱导 96、72、48、24 h; 7. GH 纯化产物。

M—Low molecular weight protein marker; 1. Standard cGH; 2. GS115 (pPICZaA); 3~6. GS115 (pPICZaA-GH) induced for 96, 72, 48 and 24h; 7. Purified cGH.

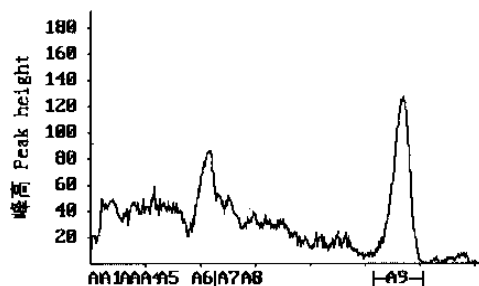


图4 凝胶图像分析报告

Fig. 4 Tiger gel image analysis report

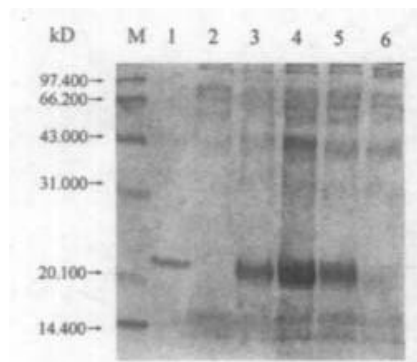


图3 rcGH在不同pH的表达

Fig. 3 Expressions of rcGH at different pH

M—蛋白; 1. 标准鲤 GH; 2. GS115 (pPICZaA); 3~6. GS115 (pPICZaA-GH) 分别在 pH 为 6.5、6.0、5.5、4.5 的表达

M—Low molecular weight protein marker; 1. Standard cGH; 2. GS115 (pPICZaA); 3~6. GS115 (pPICZaA-GH) expressed at pH 6.5, 6.0, 5.5 and 4.5.

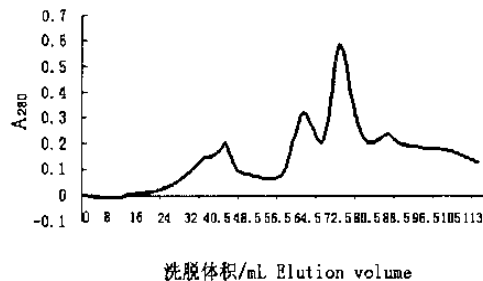


图5 Q-Sepharose FF 柱层析洗脱曲线

Fig. 5 Elution curve of anion exchange chromatography

表1 重组 rcGH 对罗非鱼的促生长效果

Table 1 Effects of injections of recombinant GH on growth of tilapia fingerling

时间/周 Time/Week	对照组 Control		实验组 1 Group 1		实验组 2 Group 2	
	体重/g Weight	体长/cm Length	体重/g Weight	体长/cm Length	体重/g Weight	体长/cm Length
0	17.16 ± 0.54	8.10 ± 0.12	17.15 ± 0.60	8.08 ± 0.11	17.08 ± 0.48	8.06 ± 0.15
1	18.72 ± 0.65	8.40 ± 0.16	18.83 ± 0.77	8.41 ± 0.14	18.92 ± 0.81	8.40 ± 0.20
2	19.13 ± 0.77	8.60 ± 0.26	19.85 ± 1.23	8.68 ± 0.25	20.09 ± 1.53	8.71 ± 0.28
3	20.18 ± 1.42	8.92 ± 0.37	21.32 ± 2.19	9.08 ± 0.33	21.87 ± 2.45*	9.12 ± 0.35
4	23.56 ± 2.22	9.41 ± 0.49	25.81 ± 3.05*	10.01 ± 0.45	26.72 ± 3.18*	10.13 ± 0.51
5	26.60 ± 2.76	9.80 ± 0.64	28.89 ± 3.52*	10.18 ± 0.61	30.32 ± 3.86**	10.21 ± 0.67
6	30.30 ± 3.41	10.09 ± 0.71	33.22 ± 4.57**	10.27 ± 0.80	35.36 ± 4.65**	10.39 ± 0.92*

注 Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

毕赤酵母是近年来广泛使用的外源基因表达系统, 该系统具有表达产率高、遗传稳定、产物可高效分泌、发酵工艺成熟等优点, 是真核基因表达的理想

宿主^[8]。但毕赤酵母细胞胞内含有较多的杂蛋白, 表达产物很难进行纯化。而毕赤酵母自身的分泌蛋白很少, 在培养基中, 外源蛋白占总蛋白的含量较高^[9], 利用分泌途径表达外源蛋白, 可大大减少基因工程下游的分离提纯工作。本文用毕赤酵母分泌

表达了有活性的 rcGH, 并用离子交换层析法得到了纯度较高的生长激素产品。

在培养基的选择上, 多数研究者在培养阶段和诱导阶段分别使用 2 种培养基, 即 BMGY 和 BM-MY, 这种方法使用了双倍的培养基, 而且增加了转换培养基过程中的污染, 在大规模的发酵生产中, 也难以操作。在表达 GH 时, 我们采取只用 BMGY 培养基, 当菌体长至一定密度时, 直接加入 0.5% 的诱导物甲醇, 也得到较高的表达水平。同时对 2 种方法进行了比较, 所得到的 GH 表达量差别不大。

本实验只研究了诱导时间和 pH 对 GH 表达量的影响, 初步优化了表达条件, 在摇瓶培养的条件下, pH 6.0, 诱导 72 h 时, GH 表达量为 300~400 mg/L。影响外源蛋白表达量的因素较多, 除了基因本身的序列外, 还包括培养温度、溶解氧水平、通气量、搅拌速度、营养补充及诱导条件等。一般用发酵罐培养的情况下, 这些条件更容易得到优化, 大量实验表明, 毕赤酵母在发酵条件下的表达量比摇瓶条件下高 10~20 倍^[10]。目前, 我们正准备进行发酵罐实验, 进一步探索表达并纯化 rcGH 的最适条件, 大量生产 rcGH, 为 GH 的生理作用研究及在水产养殖上的应用创造条件。

参考文献:

- [1] Donaldson E M, Fagerlund U H, Higgs D A, et al. Hormonal enhancement of growth[J]. Fish Physiol, 1979, 8:455-597.
- [2] Gill J A, Sumter E M, Donaldson H M, et al. Recombinant chicken and bovine growth hormone accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Bio Technol, 1985, 3:643-646.
- [3] 白俊杰, 罗建仁. 基因重组鱼生长激素的表达及促生长作用研究进展[A]. 迈向 21 世纪的渔业科技创新[C]. 北京: 海洋出版社, 2000. 70-74.
- [4] 陈丹, 杨丰, 王伟, 等. 鲈鱼生长激素在甲醇酵母中的胞内表达[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(2):140-143.
- [5] 马进, 白俊杰, 李新辉, 等. 虹鳟生长激素 cDNA 在酵母中的表达[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4):434-438.
- [6] 李英华, 白俊杰, 李新辉, 等. 鲤鱼生长激素在毕赤酵母中的表达[J]. 生物化学与分子生物学报, 2001, 17(4):69-72.
- [7] 白俊杰, 马进, 简清, 等. 鲤鱼生长激素基因克隆及原核表达[J]. 生物化学与分子生物学报, 1999, 15(3):409-412.
- [8] 欧阳立明, 张惠展, 张嗣良, 等. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2):151-154.
- [9] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression[J]. Curr Opin Biotech, 1995, 6:527-533.
- [10] 彭毅, 杨希才, 康良仪. 影响甲醇酵母外源蛋白表达的因素[J]. 生物技术通报, 2000, 4:33-36.

Secreted expression and purification of common carp GH in yeast

LI Ying-hua^{1,2}, BAI Jun-jie¹, JIAN Qing¹, YE Xing¹, LI Xin-hui¹, LUO Jian-ren¹, LIANG Xu-fang²

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,

Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China;

2. Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The recombinant carp growth hormone yeast Gs115(pPICZαA-GH) was cultured in shaking flask at 28-30 °C and 200-300 r/min for a night and then induced by methanol for 4 d. The carp growth hormone rcGH was expressed in the yeast Gs115(pPICZαA-GH). In order to investigate the influence of inducing time duration and pH on rcGH expression, the samples were designed at four inducing durations (24, 48, 72 and 96 h) and four pH levels (4.5, 5.5, 6.0 and 6.5) to be detected. The results show that when induced for 72 h, rcGH expression reaches the highest level and the optimum pH is 6.0. By analysis of Tiger Gel Image Scanner, the secreted rcGH accounts for 36.41% of the total supernatant proteins with the yield of 300-400 mg/L. The purified product rcGH was obtained by use of Q-Sepharose anion-exchange chromatography and was dissolved in sterile saline and injected into tilapia intraperitoneally at the dose of 0.1 μg/g body weight for one test group and 1 μg/g body weight for another. Six weeks later the later group got higher growth rate and both of the two groups had higher growth rates than the control.

Key words: *Pichia pastoris*; common carp GH; secreted expression; purification; growth promoting

Corresponding author: BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net