



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101356191 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200680050714. 7

代理人 罗菊华

(22) 申请日 2006. 11. 20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 14/575 (2006. 01)

2005-0231 2005. 11. 22 CU

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

CN 1557835 A, 2004. 12. 29,

2008. 07. 08

WO 9426897 A2, 1994. 11. 24,

(86) PCT申请的申请数据

CN 1622821 A, 2005. 06. 01,

PCT/CU2006/000013 2006. 11. 20

审查员 王翔宇

(87) PCT申请的公布数据

W02007/059714 ES 2007. 05. 31

(73) 专利权人 遗传工程与生物技术中心

地址 古巴哈瓦那

(72) 发明人 J·M·卢戈冈萨雷斯

M·P·埃斯特拉达加西亚

A·罗德里格斯马龙

Y·卡普里奥冈萨雷斯

A·莫拉莱斯罗哈斯

O·罗德里格冈萨雷斯德索沙

R·莫拉莱斯费尔南德斯

F·F·埃雷拉米亚莱斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 1 页 说明书 10 页

序列表 7 页 附图 5 页

(54) 发明名称

用于水生生物培养的神经肽

(57) 摘要

本发明涉及垂体腺苷酸环化酶激活肽的变体用于刺激水生生物的生长和改善水生生物的免疫系统的用途。所述肽的变体通过浸没、注射或作为食物添加剂来提供。

1. SEQ ID No 12、SEQ ID No 13 或 SEQ ID No 14 所示的 PACAP 神经肽即垂体腺苷酸环化酶激活肽在制备用于增加鱼类或甲壳类培养物的生产率中的用途,其中所述 PACAP 神经肽以对于刺激其生长或增加其抗病力或两者来说有效的量给培养中的鱼类或甲壳类饲喂或施用。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 PACAP 神经肽用于在鱼类中增加促乳素分泌和改善渗透调节。

3. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 PACAP 神经肽用于在水生生物中调节食欲。

4. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 PACAP 神经肽用于在观赏鱼类和甲壳类中促进颜色的形成。

5. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 PACAP 神经肽通过化学合成获得。

6. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 PACAP 神经肽通过重组技术获得。

7. 根据权利要求 6 的用途,其中所述 PACAP 神经肽无需纯化而以包含在大肠杆菌破裂上清液中的形式进行使用。

8. 根据权利要求 6 的用途,其中所述 PACAP 神经肽无需纯化而以包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的形式进行使用。

9. 根据权利要求 6 的用途,其中所述 PACAP 神经肽以从重组生产系统中纯化的形式进行使用。

10. 根据权利要求 1 的用途,其中通过间隔为 3 天的定期注射,以 $0.1 \mu\text{g/g}$ 动物体重的浓度,将所述 PACAP 神经肽应用于鱼类或甲壳类。

11. 根据权利要求 1 的用途,其中通过以 1-4 天的间隔在淡水或海水中进行浸浴,以 $100\text{--}200 \mu\text{g PACAP/L}$ 水的浓度,将所述 PACAP 神经肽提供给鱼类或甲壳类。

12. 根据权利要求 1 的用途,其中作为配合饲料,以 5mg PACAP/Kg 饲料的浓度,将所述 PACAP 神经肽提供给鱼类或甲壳类。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项的用途,其中将所述 PACAP 神经肽提供给 *Oreochromis* 属物种罗非鱼。

14. 根据权利要求 1-12 中任一项的用途,其中将所述 PACAP 神经肽提供给胡鲈属物种鲈鱼。

15. 根据权利要求 1-12 中任一项的用途,其中将所述 PACAP 神经肽提供给鲑属物种鲑鱼。

16. 根据权利要求 1-12 中任一项的用途,其中将所述 PACAP 神经肽提供给对虾属物种对虾。

17. 根据权利要求 1 的用途,其中将所述 PACAP 神经肽提供给鱼类或甲壳类,以预防或处理由致病体引起的感染。

用于水生生物培养的神经肽

技术领域

[0001] 本发明涉及农牧业生物技术领域,特别是垂体腺苷酸环化酶激活肽在水生生物培养中的用途。当将该肽通过浸没、注射或作为食物添加剂应用于水生生物时,获得了这些生物的食欲的增加,更大的生长和存活率,优良的免疫活性和促乳素释放的增加。

现有技术

[0002] 垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 在 1989 年首次从牛下丘脑中分离,并且证实其刺激生长激素分泌的能力是通过腺苷酸环化酶激活来实现的 (Miyata 等人 (1989) Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 :567-574)。PACAP 属于包括肠促胰液素、胰高血糖素和血管活性肠肽的肽家族 (Arimura 和 Shioda (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors: Neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.* 16 : 53-88)。在哺乳动物中, PACAP 的前体和生长激素释放激素 (GHRH) 由 2 种不同基因编码 (Hosoya 等人 (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1129 :199-206)。在迄今为止研究的所有亚哺乳动物 (submammalian) 物种 (鸟类、爬行动物和鱼类) 中, GHRH 和 PACAP 肽由相同基因编码并且包含在相同前体中 (Montero 等人 (2000) Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *Journal of Molec. Endocrinol.* 25 :157-168)。PACAP 基因基本上在下述部位中表达: 中枢和外周神经系统、支配眼的神经纤维、呼吸道、唾液腺、胃肠道、生殖系统器官、胰腺和泌尿道。它也在肾上腺、生殖腺和免疫细胞中合成 (Sherwood 等人 (2000) The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Review* 21 :619-670)。PACAP 显示出不同的生物功能,这与其在不同组织中的各种分布以及其促垂体、神经传递、神经调节和血管调节活性相一致 (Chatterjee 等人 (1997) Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. Alternative splicing within the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 272 :12122-12131)。

[0003] 它参与细胞分裂、分化和死亡的调节 (Sherwood 等人 (2000) The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Review* 21 :619-670)。

[0004] PACAP 刺激生长激素 (GH) 释放。该肽在 GH 释放中的效应已在体外在几种哺乳动物物种、鸟类、两栖类 (Hu 等人 (2000) Characterization and messenger ribonucleic acid distribution of a cloned pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor in the frog *Xenopus laevis* brain. *Endocrinol.* 141 :657-665) 和 鱼

类 (Anderson L.L. 等人 (2004) *Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches*. Society for Experim. Biol. and Med. 229 :291-302) 中得到证实。关于 PACAP 在体内 GH 分泌和释放中的作用的研究很少。迄今为止, 已知这种肽在体内增加大鼠血浆 (Jarr 等人 (1992) *Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on in vivo and in vitro prolactin and growth hormone release in male rats*. Life Sci. 51 :823-830) 和牛血浆 (Radcliff 等人 (2001) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle*. Domestic. Animal. Endocrinol. 21 :187-196) 中的 GH 水平。然而, 在母绵羊 (Sawangjaroen 和 Curlewis (1994) *Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe*. J. Neuroendocrinol. 6 :549-555) 和人 (Chiodera 等人 (1996) *Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on adenohypophyseal hormone secretion in normal men*. Clin. Neuroendocrinol. 64 :242-246) 中, 它不产生这种效应。

[0005] 这些发现暗示, 在哺乳动物中, 该肽对于 GH 分泌的影响从一个物种到另一个物种不同 (Anderson 等人 (2004) *Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches*. Society for Experim. Biol. and Med. 229 :291-302)。

[0006] 迄今为止, 在鱼类中没有显示出 PACAP 在 GH 调节中的功能的体内研究, 另外不存在在水生生物的食欲刺激中使用这种肽的先例。到目前为止, 在甲壳类中, 没有这种肽存在的证据, 并且不知道在这些生物中调节生长的信号级联。

[0007] PACAP 在哺乳动物中通过垂体细胞来刺激促乳素释放 (Ortmann 等人 (1999) *Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells*. Eur. J. Endocrinol. 140 :207-214)。它通过垂体的促黑素激素细胞来促进促黑素 (促黑素细胞激素, MSH) 释放 (Vaudry 等人 (2000) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions*. Pharmacol. Rev. 52 :269-364)。

[0008] 在鱼类中没有显示出这种肽在促乳素释放中的活性的体内研究。同样也没有关于其在鱼类颜色形成中的影响的发现。

[0009] 在哺乳动物中, PACAP 对于免疫系统的功能得到非常充分的表征, 并且存在描述了其在人作为免疫应答调节剂的用途的几个专利。迄今为止, 在解释 PACAP 在水生生物中对于免疫系统的作用的文献方面没有先例。

[0010] 已从几种脊椎动物物种和 1 种原索动物 (被囊动物) 中克隆了 PACAP 基因。在鱼类中, 已分离出鲑鱼和鲑鱼 (Sherwood 等人 (2000) *The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily* Endocrine Reviews 21(6) :619-670)、金鱼 (Leung 等人 (1999) *Molecular cloning and tissue distribution of in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) the goldfish*. Rec. Progr. Mol. Comp. Endocrinol. 338-388)、斑马鱼 (Fradinger 和 Sherwood (2000) *Characterization of the gene encoding*

both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 165 :211-219)、鳟鱼 (Krueckl 和 Sherwood. (2001) Developmental expression, alternative splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GRF) gene in rainbow trout. *Molec. and Cell. Endocrinol.* 182 :99-108) 的一些物种的 PACAP 基因。专利 US 5695954 保护编码鱼类 GHRH-PACAP 多肽的基因核苷酸序列的分离和纯化, 以及表达这些序列的载体和宿主, 目的在于用于通过将所述遗传构建体引入受精的鱼卵中经由转基因来增加鱼类的生长。它还保护用于检测包含这些序列的转基因鱼类的方法。

[0011] 在这个专利中特别地报道了编码红大麻哈鱼 (*Oncorhynchus Nerka*)、大头胡鲶 (*Clarias macrocephalus*) 和美国白鲟 (*Acispenser transmontanus*) 物种的 GHRH-PACAP 多肽的基因序列。

[0012] 在本发明中使用在我们实验室对于尖齿胡鲶 (*Clarias gariepinus*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 物种而获得的 PACAP 氨基酸序列的不同变体, 其具有 N- 末端修饰。这些变体经由非转基因方式在水生生物中用作生长刺激剂, 其中它们的施用通过其表达在大肠杆菌 (*E. coli*) 和巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 培养物上清液中并经由浸浴来进行, 无需事先纯化它们。出乎意料地, 我们发现这些变体在这些条件下能够促进这些生物中的免疫活性的显著增加和升高血清中的促乳素浓度。对于水生生物还没有描述过所述肽的这些性质。

[0013] 某些作者已报道了在鱼类中通过经由浸浴施用重组生长激素而造成的生长刺激效应。然而, 生长激素的直接使用受许多规章要求的影响, 相同的情况也发生于表达生长激素或生长激素释放因子的转基因鱼类的使用。

[0014] 在本发明中描述了用于增加水生生物的生长和改善水生生物的免疫系统的非转基因方法, 所述水生生物包括无脊椎动物。

[0015] 当今, 水生生物是蛋白质的重要来源, 但在其天然环境中的捕获已被充分开发。由于这个原因, 为了增加生产, 必需培养这些水生物种 (Pullin 等人; Conference Proceeding 7, 432p. International Center for living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines. 1982, ISSN 0115-4389)。

[0016] 通过刺激生长、增加存活和改善幼体的品质来增加水生生物培养的效益仍是水产业中待解决的重要问题。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明给出了上述问题的解决方法, 提供了具有鉴定为 SEQ ID No12、13 和 14 的氨基酸序列的垂体腺苷酸环化酶激活肽的变体, 它们在短时间段内增加水生生物 (包括无脊椎生物) 的生长速率, 这对于水产业是非常重要的, 此外, 当通过浸浴或作为饲料添加剂来应用时, 这些肽增加具有商业利益的鱼类和甲壳类幼体的存活。它们刺激这些生物中的免疫活性, 以及食欲、鱼类颜色形成和促乳素释放。

[0019] 在本发明的一个优选实施方案中, PACAP 变体通过下述方式应用于鱼类或甲壳类: 以 3 天的间隔和以 0.1 μ g/g 动物体重的浓度进行定期注射, 以 1-4 天的间隔和以 100-200 μ g/L 水的肽浓度在淡水或海水中进行浸浴, 和以 5mg/Kg 配合饲料的浓度作为饲

料添加剂进行使用。获得了生长的显著增加和优良的免疫活性。

[0020] 由于其小的尺寸 (5KDa), 本申请的 PACAP 变体提供了下述优点: 当它通过浸浴 (一种呈现出对于水产业来说的成本和操作优点并具有低污染指数的施用途径) 进行应用时, 使得能够通过这种生物的皮肤和粘膜被良好吸收, 此外, PACAP 信号转导机制由腺苷酸环化酶的激活来诱导而不通过激素的激活, 并且其在哺乳动物 (包括人) 中的生长激素释放活性很弱, 这是为什么其的使用显示出更好的公众理解和更少的规章要求的原因。

[0021] PACAP 的其他优点是其刺激鱼类中的先天性和适应性免疫活性和增加对致病体感染的抵抗力的能力。

[0022] 在本发明的一个实施方案中, 给水生生物, 例如 *Oreochromis* 属物种 (*Oreochromis* sp.) 罗非鱼、胡鲇属物种 (*Clarias* sp.) 鲇鱼、鲑属物种 (*Salmon* sp.) 鲑鱼和对虾属物种 (*Penaeus* sp.) 虾提供 PACAP 变体。

[0023] 在本发明的另一个优选实施方案中, 给鱼类或甲壳类提供 PACAP 变体以预防或治疗由致病体引起的感染。

[0024] 本发明的一个实施方案描述了组合物的制备, 所述组合物用于处理培养中的鱼类或甲壳类以刺激其生长和增强其抗病力, 以及用于预防或治疗性地治疗由致病体引起的感染, 所有这些的目的是改善生产率。

[0025] 附图简述:

[0026] 图 1. 在细菌表达载体 (图 1A) 和酵母表达载体 (图 1B) 中的 PACAP 克隆策略。

[0027] 图 2. 通过以 $0.1 \mu\text{g/g}$ 动物体重的剂量腹膜内注射重组 PACAP 来进行的在年幼尖齿胡鲇中的生长刺激实验, 所述重组 PACAP 经由亲和层析进行纯化。该图显示了与对照组相比较的 PACAP 处理组的体重的平均值。

[0028] 图 3. 通过以 $0.1 \mu\text{g/g}$ 动物体重的剂量腹膜内注射重组 PACAP 来进行的在年幼尖齿胡鲇中的生长刺激实验, 所述重组 PACAP 经由亲和层析进行纯化。该图显示了与对照组相比较的 PACAP 处理组的肝体细胞指数 (hepatosomatic index) 和肌肉干重的平均值。

[0029] 图 4. 通过浸没在以 $100 \mu\text{g/L}$ 水的剂量包含重组 PACAP 的大肠杆菌破裂上清液中来进行的在罗非鱼幼体中的生长刺激实验。图 4A 和 4B 显示了与阴性对照相比较的处理组的平均体重和长度。

[0030] 图 5. 通过浸没在以 $100 \mu\text{g/L}$ 水的剂量包含重组 PACAP 的大肠杆菌破裂上清液中来进行的在罗非鱼幼体中的生长刺激实验。该图显示了在处理开始后 22 天与阴性对照相比较的处理组的平均体重。

[0031] 图 6. 通过浸没在以 $100 \mu\text{g/L}$ 水的剂量包含重组 PACAP 的大肠杆菌破裂上清液中来进行的在罗非鱼幼体中的生长刺激实验。该图显示了在最后一次浸浴后 30 天, 相对于对照组 (B), 经 PACAP 处理的鱼 (A 和 C) 在长度方面的差异。

[0032] 图 7. 通过浸没在以 $100 \mu\text{g/L}$ 水的剂量包含重组 PACAP 的大肠杆菌破裂上清液中来进行的在罗非鱼幼体中的生长刺激实验。该图显示了相对于对照组 (C), 经 PACAP 处理的鱼 (A 和 B) 中鱼类颜色的较早形成。

[0033] 图 8. 在尼罗罗非鱼这一物种的年幼罗非鱼中, 用于估经由亲和层析纯化的重组 PACAP 对于食欲的影响的实验, 以 $0.5 \mu\text{g/g}$ 动物体重的剂量。该图显示了在处理开始的 6 小时和 22 小时内由鱼摄取的食物量的平均值。

[0034] 具体实施方案 / 实施例的详述

[0035] 实施例 1 :构建包含 PACAP 的编码序列的表达载体,以用于其在大肠杆菌中的细胞内表达以及其在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的细胞外生产。

[0036] 通过聚合酶链式反应来分离尖齿胡鲈的 PACAP 基因,其中使用先前克隆到 T 载体内的 GHRH-PACAP cDNA 作为模板。使用相应于序列 SEQID No 1 和 SEQ ID No 2 的特异性寡核苷酸,以获得包括信号肽序列的 GHRH-PACAP 全序列,和使用特异性寡核苷酸 SEQ ID No 3 和 SEQ ID No 4,以仅扩增出具有对于其克隆到大肠杆菌表达载体中来说所必需的限制位点的 PACAP 基因。

[0037] 使用特异性寡核苷酸 SEQ ID No 3 和 SEQ ID No 4,如上文所述类似地来分离罗非鱼的 PACAP 基因。本发明是在罗非鱼中分离这种基因的第一个报道。

[0038] 使用限制位点 NdeI 和 BamHI 将 PACAP 编码序列克隆到大肠杆菌表达载体 pAR 3040 中(图 1A)。选择一个重组质粒以转化大肠杆菌 BL21D3 细菌,并诱导在 T7 启动子的调控下的 PACAP 表达,其中使用 0.5mMIPTG 作为诱导物。

[0039] 基因表达于 28°C 进行 5 小时。重组 PACAP 的表达及其完整性通过质谱法进行确认。

[0040] 对于在巴斯德毕赤酵母中的 PACAP 表达,使用酵母表达载体 pPS9 和 pPS10。对于在 pPS9 中的克隆使用特异性寡核苷酸 SEQ ID No 7 和 SEQ ID No 6,和对于在 pPS10 中的克隆使用寡核苷酸 SEQ ID No 5 和 SEQ ID No 6。对于在载体 pPS7 中的克隆使用限制位点 NcoI 和 SpeI,这种克隆方法在 N- 末端给目的蛋白添加甲硫氨酸和甘氨酸。对于在载体 pPS10 中的克隆,使用限制位点 NaeI 和 SpeI,这种克隆策略不给目的蛋白添加氨基酸(图 1B)。

[0041] 在转化前,用酶 Sph I 对质粒进行线性化。通过电穿孔用重组表达载体转化巴斯德毕赤酵母 MP36 菌株。该菌株是在转化后获得 His⁺ 表型的 his3 营养缺陷型突变体。

[0042] 通过斑点印迹法鉴定的转化体还通过 Southern 印迹法进行分析,以确定哪一些通过用重组质粒的表达盒替换巴斯德毕赤酵母的基因 AOX1 而发生了整合。该整合事件产生 Mut^s(低水平的甲醇利用)和 His⁺ 表型。AOX1 的基因替换通过载体和基因组之间 AOX1 启动子和 3' AOX1 的区域的重组而发生。作为重组的结果,在 AOX1 的编码区中发生缺失。具有 Mut^s 表型的重组菌株支持 AOX2 基因中的醇氧化酶(alcoholoxidase,AOX)产生,且它们在甲醇中具有低生长率。

[0043] 编码目的多肽和罗非鱼生长激素的基因在可由甲醇诱导的 AOX1 启动子的调控之下,并且它们具有信号肽。巴斯德毕赤酵母分泌低水平的自身蛋白质,并且其培养基不需要蛋白质作为补充物。因此,可以预期,分泌的异源蛋白质将占培养基中总蛋白质的高百分比(超过 80%) (Tschopp 等人;Bio/Technology 1987,5:1305-1308;Barr 等人;Pharm. Eng. 1992,12:48-51)。在向培养基中添加了甲醇的 5L 生物反应器之中完成本发明中说明的重组蛋白质的产生。

[0044] 实施例 2 :在年幼尖齿胡鲈中进行的生长刺激实验,测定鱼的肝体细胞指数和肌肉干重。

[0045] 使用大约相同年龄和具有 30-40 克平均体重的尖齿胡鲈物种的 18 条鲈鱼,不进行性别区分。

[0046] 限定 2 个实验组, 每组 9 个个体。将所述组在具有稳定的水再循环的单独的箱中进行适应, 在 28°C 的温度下以及采用 14 小时光和 10 小时暗的光周期。动物每天喂养 2 次, 采用相当于每个箱中总体重的 5% 的定量。动物在实验前进行鉴定。一组用半纯化的 PACAP (70% 的纯度) SEQ ID No. 13 进行处理, 而用作对照组的另一组用包含在 1X PBS 中的大肠杆菌蛋白质 (通过与目的肽相同的纯化操作程序而获得的大肠杆菌蛋白质, 其量相当于纯化的 PACAP 样品中存在的污染物的量) 进行处理。用 PACAP 进行处理的鱼以 0.1 μ g 肽 / 克动物体重的剂量进行腹腔内注射, 每周 2 次。对照组如上所述类似地进行注射。实验开始后 22 天, 在腹腔中注射了 PACAP 的动物与阴性对照相比较而言显示出体重的显著增加 ($p < 0.05$) (图 2)。

[0047] 测定肝体细胞指数和肌肉干重, 以证实鱼体重的增加不是由于器官尺寸的增加, 或肌肉含水量的增加。

[0048] 没有观察到实验组的肝体细胞指数值和肌肉干重值之间的显著差异 (图 3)。

[0049] 当应用序列 SEQ ID No. 12 的重组 PACAP 时, 获得类似的结果。

[0050] 实施例 3: 通过用包含重组 PACAP 的大肠杆菌破裂上清液浸浴而在罗非鱼幼体中进行的生长刺激、对致病体的抵抗力和促乳素释放的实验。

[0051] 进行实验以评估存在于大肠杆菌破裂上清液中的尖齿胡鲈重组 PACAP 对于罗非鱼幼体生长的作用。

[0052] 限定 2 个实验组, 每组 60 个个体, 一组用 PACAP 神经肽 (SEQ ID No. 13) 进行处理, 和另一组用作对照组。将这些幼体组在具有稳定的水再循环的单独的箱中进行适应, 这在 28°C 的温度下以及采用 14 小时光和 10 小时暗的光周期来进行, 并且动物用根据下式获得的量进行喂养: 食物的量 = 动物的 # \times 平均体重 (g) \times 40% / 100。处理由下列组成: 在 2L 水中浸浴, 在 20 天期间每周 3 次, 持续 60 分钟, 剂量为 200 μ g 靶蛋白 / L 水。

[0053] 由此获得, 在实验开始 10 天, PACAP 处理组显示出与对照组相比而言显著的体重和长度增加 ($p < 0.01$), 在实验开始 15 天, 组间差异是高度显著的 ($p < 0.001$) (表 1 以及图 4A 和 4B)。在浸浴开始 20 天, PACAP 处理组和对照组之间的差异在统计学上是显著的 ($p < 0.001$) (图 5)。

[0054] 表 1. 在实验开始 10 天和 15 天, 罗非鱼幼体的体重和长度的平均值。

[0055]

处理	体重 (g)		长度 (cm)	
	10 天	15 天	10 天	15 天
PACAP	0.3536 \pm 0.0879	0.6458 \pm 0.2399	2.41 \pm 0.2726	2.84 \pm 0.3627
对照	0.2221 \pm 0.0565	0.2785 \pm 0.1438	1.98 \pm 0.1687	2.01 \pm 0.5174

[0056] 体重和长度显示为平均值 \pm S. D.

[0057] 观察到, PACAP 对于生长的影响随着时间过去而继续保持, 因为在最后一次浸浴后 30 天, 实验组动物的体重和长度的差异是非常显著的 ($p < 0.01$) (图 6)。

[0058] 此外, 观察到, 与阴性对照相比较, 经 PACAP 处理的鱼在早期发育阶段显示出皮肤着色 (图 7)。

[0059] 在这个实验中, 还研究了皮肤原生动物车轮虫属物种 (Trichodinasp) 的存在, 为

此从每个实验组中随机选择 10 个动物,并测定由这种致病体引起的侵入的强度。侵入强度的值根据下式进行测定:

[0060] $(I : \text{寄生虫总 \# / 鱼}) I = \Sigma N/n - F_0$ 和 $E = n - F_0 \times 100/n$, 其中

[0061] I : (平均侵入强度) E : (总数中受寄生虫侵袭的鱼的 #)

[0062] ΣN : (发现的寄生虫总数) F_0 : (未受寄生虫侵袭的鱼的数目)

[0063] n : (经分析的鱼的数目)。

[0064] 经 PACAP 处理的鱼显示出相对于对照组 (I 的平均值 = 5.56) 而言明显更低的由原生动物的车轮虫属物种造成的侵入强度 (I 的平均值 = 2.20) ($p < 0.01$)。

[0065] 在实验开始 45 天,在与先前描述相同的条件下通过浸浴对鱼进行处理,并且在处理后 24 小时对每组 10 个动物进行抽血,以通过 Western 印迹法和 ELISA 来测量血清中的促乳素。对于这些测定法使用抗罗非鱼促乳素多克隆抗体。观察到, PACAP 治疗组和对照组之间的统计学上显著的差异 $p < 0.01$ (表 2)。这些在商业水生生物中是非常有吸引力的结果,如在鲑鱼中的情况,所述鲑鱼具有在淡水和海水中的生命周期,并且其中促乳素在渗透调节中起重要作用。

[0066] 表 2. 在实验开始 45 天,在罗非鱼血清中的促乳素浓度 (ng/mL)

[0067]

促乳素浓度	PACAP 处理组	对照组
ng/mL	36.860 ± 2.695*	15.745 ± 1.362

[0068] 浓度显示为平均值 ± S. D.

[0069] * 表明显著的差异 $P < 0.01$

[0070] 实施例 4 :用于评估重组 PACAP 对于尼罗罗非鱼的年幼罗非鱼食欲的影响的实验。

[0071] 迄今为止,仍未研究在鱼类中 PACAP 对于食欲的生物学效应。在亚哺乳动物的脊椎生物中,这种肽对于食欲的活性已得到少许表征 (Jensen, 2001, Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. Comp. Biochem. And Physiol. Part A 128 :471-479)。

[0072] 为了分析 PACAP 对于鱼类食欲的影响,使用尼罗罗非鱼物种的罗非鱼,它们随机进行选择,不区分性别以及具有大约相同的平均体重。限定 3 个实验组,每组 3 个个体,并且每组 3 次重复。将所述组在具有稳定的水再循环的单独的箱中进行适应,在 28°C 的温度下以及采用 14 小时光和 10 小时暗的光周期。

[0073] 一个组通过以 0.5 μg/g 动物体重进行腹膜内注射而用半纯化的 PACAP (87% 的纯度) SEQ ID No. 13 进行处理。第二个组以 0.1 μg 肽 / 克动物体重的剂量通过相同施用途径用 GHRP-6 (Lipotec, S. A, Spain) 进行处理。对照组用包含在 1X PBS 中的大肠杆菌蛋白质 (通过与目的肽相同的纯化操作程序而获得的大肠杆菌蛋白质,其量相当于纯化的 PACAP 样品中存在的污染物的量) 进行处理。

[0074] 在处理后,给 3 个实验组添加相同量的食物,在 6 小时的时候收集未摄取的食物并再次添加食物。实验开始 22 小时,再次测量食欲。

[0075] 将每个箱中未摄取的食物在炉中进行干燥 (100°C, 24 小时),并在分析天平中进行称重。通过确定向箱中添加的食物 (10 克,具有 20% 的湿度) 和未由鱼摄取的食物之间

的差异,计算出被摄取的食物。

[0076] 与对照组相比较,经 PACAP 和 GHRP-6 处理的罗非鱼显示出显著的食欲增加 ($p < 0.05$) (图 8)。

[0077] 实施例 5:重组 PACAP 在鲑鱼尖齿胡鲈免疫系统中的评估。

[0078] 使用年幼的尖齿胡鲈。限定 2 个组,其中每组 10 个个体。将所述组在具有稳定的水再循环的单独的箱中进行适应,在 28°C 的温度下以及采用 14 小时光和 10 小时暗的光周期。动物每天喂养 2 次,采用相当于每个箱中总体重的 5% 的定量。动物在实验前进行鉴定。用 PACAP (SEQ ID No. 13) 进行处理的鱼以 0.1 μg 肽 / 克动物体重的剂量进行腹腔内注射,每周 2 次。

[0079] 在实验开始 20 天,抽取鱼血以测量血清中的溶菌酶和凝集素水平。使用基于溶菌酶裂解溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 的能力的方法来测量血清中的溶菌酶活性。在 96 孔微托盘中,将在磷酸盐缓冲液 (0.05M, pH 6.2) 中进行 4 次 2 倍系列稀释的 100 μL 样品与 100 μL 3mg/ml 溶壁微球菌 (Sigma) 的悬浮液相混合。使微托盘于 22°C 进行温育,并在 0、2、3、5、10、15、25、35 和 45 分钟时于 450nm 处读取 O. D.。对于阳性对照,用鸡卵清溶菌酶 (从 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始的系列稀释) 代替鱼血清,和对于阴性对照,用缓冲液代替鱼血清。1 个单位的溶菌酶活性被定义为引起 0.001 分钟⁻¹ 的 O. D. 读数减少的幼体匀浆物的量。观察到在 PACAP 处理组和对照组之间的统计学上显著的差异 ($p < 0.01$) (表 3)。

[0080] 表 3. 在实验开始后 20 天,在鱼血清中的溶菌酶浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

[0081]

溶菌酶浓度	PACAP 处理组	对照组
$\mu\text{g}/\text{mL}$	21.765 \pm 5.438*	7.828 \pm 8.393

[0082] 浓度显示为平均值 \pm S. D.

[0083] * 表明显著的差异 $P < 0.01$

[0084] 为了确定血清中凝集素的存在,进行血细胞凝集测定法。使用 PBS pH 7.2 在 U 形微量滴定板 (96 孔, Greiner, Microlon) 孔中进行血清的 2 倍系列稀释,向所述孔中加入等体积的新鲜制备的 2% 红细胞悬液 (在 PBS 中的兔红细胞)。将微量滴定板在室温下温育 1 小时,并且目测读取滴度,其等于在最后 1 个显示出凝集 (如通过在整个孔底部上平均分布的细胞层所证明的) 的孔中的稀释度。检查样品的血细胞凝集活性并获得每个样品的滴度值。活性表示为滴度,即显示出完全凝集的最高稀释度的倒数。

[0085] 与对照组相比较,经 PACAP 处理的鱼显示出血清中的凝集素水平的显著增加 ($p < 0.05$) (表 4)。

[0086] 表 4. 在从实验开始起 45 天时,在鱼血清中的血细胞凝集滴度 (显示出完全凝集的最高稀释度的倒数)。

[0087]

	PACAP 处理组	对照组
滴度	4*	1

[0088] 学生检验。* 表明显著的差异 $P < 0.05$

[0089] 实施例 6 :通过用包含重组 PACAP 的巴斯德毕赤酵母培养物上清液浸没而在罗非鱼幼体中进行的生长刺激实验。

[0090] 进行实验以评估包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的尖齿胡鲂 PACAP (SEQ ID No 14) 对于罗非鱼幼体生长的影响。

[0091] 限定 3 个实验组,每组 50 个幼体。一个组用包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的重组 PACAP (SEQ ID No. 14) 进行处理。第二个组用包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的重组罗非鱼生长激素 (GH) 进行处理。对照组用未转化的巴斯德毕赤酵母培养物上清液进行处理。幼体每天喂养 2 次,采用根据下式获得的量:食物的量=动物的#×平均体重(g)×40%/100。处理通过如下方式来进行:浸没在 30L 体积中,每周 3 次,持续 90 分钟。剂量为 100 μg 靶蛋白/L 水。

[0092] 由此获得,在实验开始 5 周 (35 天), PACAP 处理组显示出与对照组相比而言显著的体重增加 ($p < 0.01$)。生长激素处理组显示出与对照组相比而言显著的体重增加 ($p < 0.05$) (表 5)。

[0093] 表 5. 以克表示的罗非鱼幼体重量。

[0094]

时间 (天)	PACAP 处理组	GH 处理组	对照组
0	0.1013±0.0625	0.1140±0.0457	0.1040±0.0535
35	0.9870±0.0525	0.7875±0.0422	0.4566±0.0363

[0095] 数据显示为体重平均值 ±S. D.

[0096] 实施例 7 :在南方滨对虾 (*Litopena eusschmitti*) 中进行的生长刺激和幼体品质改善实验,所述南方滨对虾用包含重组 PACAP 的巴斯德毕赤酵母培养物上清液进行处理。

[0097] 使用南方滨对虾物种的虾的幼体。限定 2 个实验组,每组 100 个幼体。一个组用包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的重组 PACAP (SEQ ID No. 14) 进行处理,和用作对照组的另一个组用未转化的巴斯德毕赤酵母培养物上清液进行处理。

[0098] 幼体在容量为 100L 的玻璃纤维箱中进行培养。给料基于硅藻 (纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*))、有鞭毛藻类 (司西四片藻 (*Tetraselmis suecica*)) 和卤虫的无节幼体 (Aquatic Eco-Systems Inc.)。

[0099] 非生物生长因素如下:

[0100] • 照明 (24:00L/D)

[0101] • 稳定的通风

[0102] • 34ppm 的盐度

[0103] • 溶解氧 5.2±0.5 (在幼体循环时)。

[0104] • 在 PZ_{III} 之后的再循环 80%。

[0105] 对实验组应用 4 次浸浴,每 3 天 1 次,持续时间为 1 小时。

[0106] 由此获得,PACAP 处理组显示出与对照组相比而言显著的体重增加 ($p < 0.01$) (表 6)。

[0107] 表 6. 以毫克表示的虾幼体重量。

[0108]

时间 (天)	PACAP 处理组	对照组
0	0.3045±0.0425	0.3273±0.0420
30	12.5034±0.0455	6.5325±0.0438

[0109] 数据显示为体重平均值 ±S. D.

[0110] 在 PACAP 处理组中观察到虾长度的更高的均一性（这在虾养殖中是非常重要的）和幼体的更好的品质（更多的腮分枝和额部修饰 (rostral modifications)）。在 PACAP 处理组中，在 PL9 阶段存活中的差异大于 40%。

[0111] 实施例 8：通过在鱼饮食配方中包括重组 PACAP 而实施的对于年幼尖齿胡鲈的生长刺激。

[0112] 将包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的重组 PACAP (SEQ IDNo. 14) 进行浓缩，并配制入营养鱼饮食中至约 5mg/Kg 饲料的浓度。

[0113] 限定 2 个实验组，每组 100 个幼体，具有 0.1g 的平均体重。一个组用包含在巴斯德毕赤酵母培养物上清液中的重组 PACAP (SEQ IDNo. 14) 进行处理，和用作对照组的另一个组用未转化的巴斯德毕赤酵母培养物上清液进行处理。该实验进行 30 天。

[0114] 与对照组相比较，以 5mg/Kg 饲料的剂量包括在饮食中的重组 PACAP (SEQ ID No. 14) 使生长增加 30%，具有高度显著的统计学差异 ($p < 0.01$)。

序列表

<110>Center the Genetic Engineering and Biotechnology

<120> 用于水生生物培养的神经肽

<130>Juana Maria

<140>

<141>

<150>CU 2005-0231

<151>2005-11-22

<160>14

<170>PatentIn Ver. 2. 1

<210>1

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>5' UTR

<222> (...)

<223> 用于扩增 GHRH-PACAP 基因的完整核苷酸序列的引物

<220>

<221>5' UTR

<222>(1).. (29)

<400>1

gcagccatgg ccaaatctag tagagctac 29

<210>2

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>3' UTR

<222>()..)

<223> 用于扩增 GHRH-PACAP 基因的完整核苷酸序列的引物

<220>

<221>3' UTR

<222>(1).. (31)

<400>2

ggaattcctt taatggcttg acttcgtaca t 31

<210>3

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>5' UTR

<222>()..)

<223> 用于扩增 PACAP 基因的引物

<220>

<221>5' UTR

<222>(1).. (32)

<220>

<221>5' UTR

<222>(1).. (32)

<400>3

catccatag cactcggacg gcattttcac gg 32

<210>4

<211>38

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>3' UTR

<222>()..)

<223> 用于扩增 PACAP 基因的引物

<220>

<221>3' UTR

<222>(1).. (38)

<400>4

cgggatcctt atttgtttct aaacctctgt ctgtacct 38

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>5' UTR

<222>(1).. (22)

<223> 用于扩增用于其在巴斯德毕赤酵母中表达的 PACAP 基因的引物

<400>5

cactcggacg gcattttcac gg 22

<210>6

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>3' UTR

<222>(1).. (31)

<223> 用于扩增用于其在巴斯德毕赤酵母中表达的 PACAP 基因的引物

<400>6

actagtttat ttgtttctaa acctctgtct g 31

<210>7

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221>5' UTR

<222>(1).. (30)

<223> 用于扩增用于其在巴斯德毕赤酵母中表达的 PACAP 基因的引物

<400>7

ccatgggaca ctcggacggc attttcacgg 30

<210>8

<211>727

<212>DNA

<213> 尖齿胡鲂

<220>

<221>gene

<222>(1).. (727)

<223>GHRH-PACAP 基因的完整核苷酸序列

<400>8

atggccaaat ctagtagagc tactttggct ctgctcatct acgggatctt aatgcgctac 60
 acgcccattg cacaccatc ggaatgggct tcccattat gaggctagaa aacgacgtgt 120
 tcggggacga gggaaactcg ttaagtgagc tgcctacga gccggacacg atgagcgcgc 180
 gcagtgtcc agccctccct gaagacgcat acacactgta ctaccgccc gagagaagag 240
 ccgaaacgca tgcagacgga ttgttagata gagccttgag ggacatcctg gttcagttat 300
 cagcccgaat atatctgcat tctctgacgg cagttcgcgt aggtgaggaa gaagaggatg 360
 aagaggactc ggagccactg tcgaagcgcc actcggacgg cattttcacg gacagctaca 420
 gccgctaccg gaaacaaatg gccgtaaaaa aataccttgc agcagtgtg ggaagaaggt 480
 acagacagag gtttagaaac aaaggacgcc gctttgctta tttgtagcgg ataggaagaa 540
 aaggaaagaa agaaaaaac gcgagagaga gagagagaga gagaaataga gcaactgccc 600
 tcccttgtgt ccattcaatc atacagtcag aagtctggta tctaacttaa cactgagcag 660

tcagtcggtg gatctcgect gtgtttctttt aaacatgtat tttatgtacg aagtcagcc 720
 attaaag 727

<210>9

<211>86

<212>PRT

<213> 尖齿胡鲂

<220>

<221>PROPEP

<222>()..)

<223>GHRH-PACAP 的氨基酸序列

<400>9

Met	His	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Asp	Arg	Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Val
1				5					10					15	
Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Lys	Tyr	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Ala	Val	Arg	Val
			20					25						30	
Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Ser	Glu	Pro	Leu	Ser	Lys	Arg
			35					40						45	
His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
			50					55						60	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Arg
65						70						75			80
Gln	Arg	Phe	Arg	Asn	Lys										
															85

<210>10

<211>114

<212>DNA

<213> 尖齿胡鲂

<220>

<221>gene

<222>(1)..(114)

<223>PACAP 基因的核苷酸序列

<400>10

cactcggacg gcattttcac ggacagctac agccgctacc gaaacaaat ggccgtaaaa 60
 aaataccttg cagcagtgct gggaagaagg tacagacaga ggtttagaaa caaa 114

<210>11

<211>114

<212>DNA

<213> 尼罗罗非鱼

<220>

<221>gene

<222>(1)..(114)

<223>PACAP 基因的核苷酸序列

<400>11

```
cactcggacg gcattttcac ggacagctac agccgctacc ggaaacaaat ggcagtaaaa 60
aagtatcttg cagcagtgtt gggaagaagg tacagacaga ggttttagaaa caaa      114
```

<210>12

<211>40

<212>PRT

<213> 尖齿胡鲂

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(40)

<223> 从巴斯德毕赤酵母获得的重组 PACAP 的氨基酸序列

<400>12

```
Met Gly His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg
  1           5           10           15
Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg
           20           25           30
Tyr Arg Gln Arg Phe Arg Asn Lys
           35           40
```

<210>13

<211>39

<212>PRT

<213> 尖齿胡鲂

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (39)

<223> 从大肠杆菌获得的重组 PACAP 的氨基酸序列

<400>13

Met	His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys
1				5				10				15			
Gln	Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr
			20				25				30				
Arg	Gln	Arg	Phe	Arg	Asn	Lys									
			35												

<210>14

<211>38

<212>PRT

<213> 尖齿胡鲂

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (38)

<223> 从巴斯德毕赤酵母获得的重组 PACAP 的氨基酸序列（未进行修饰）

<400>14

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5				10				15			
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Arg
			20				25				30				
Gln	Arg	Phe	Arg	Asn	Lys										
			35												

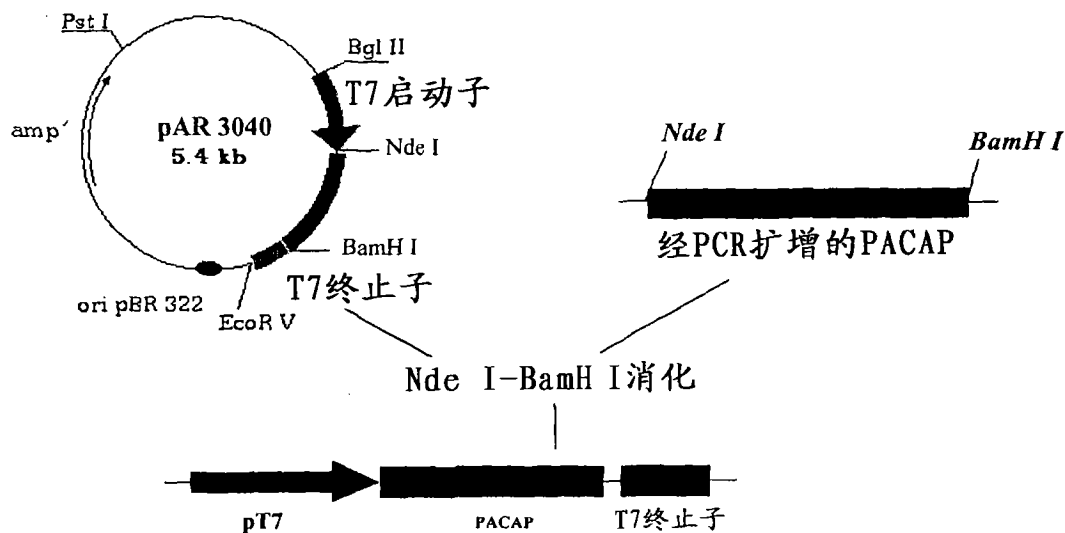


图 1A

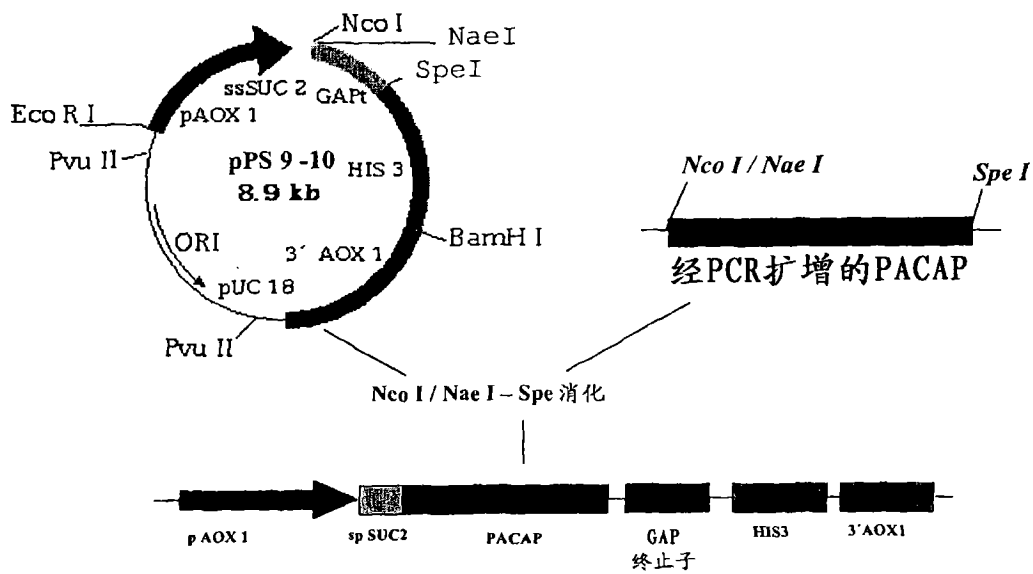


图 1B

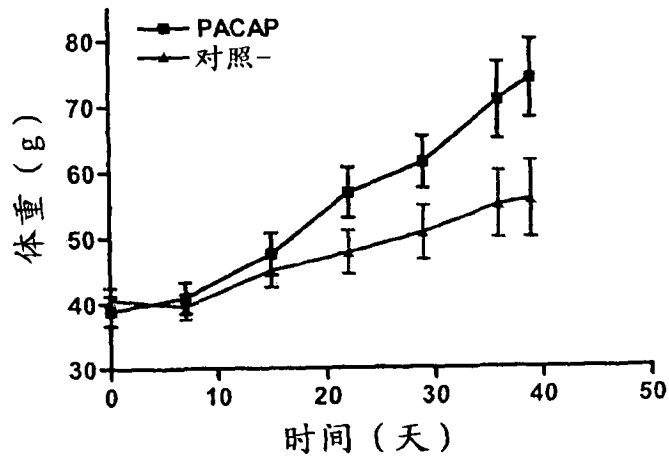


图 2

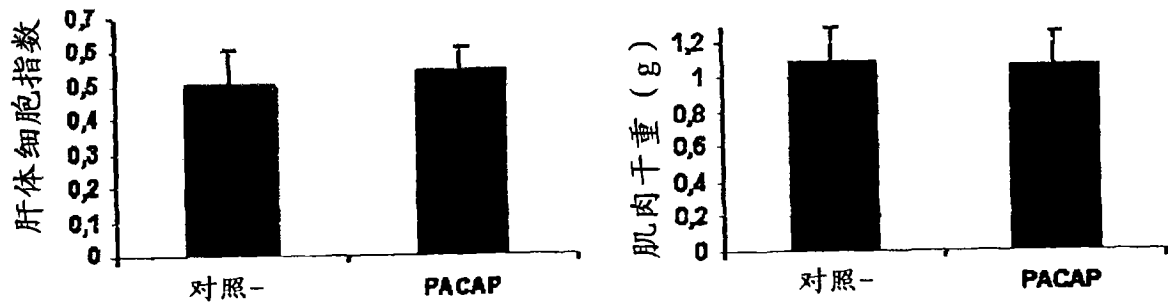


图 3

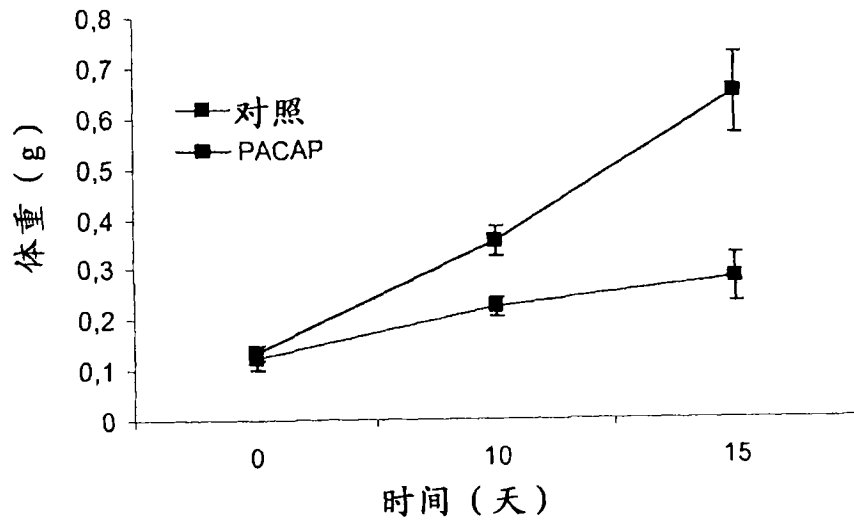


图 4A

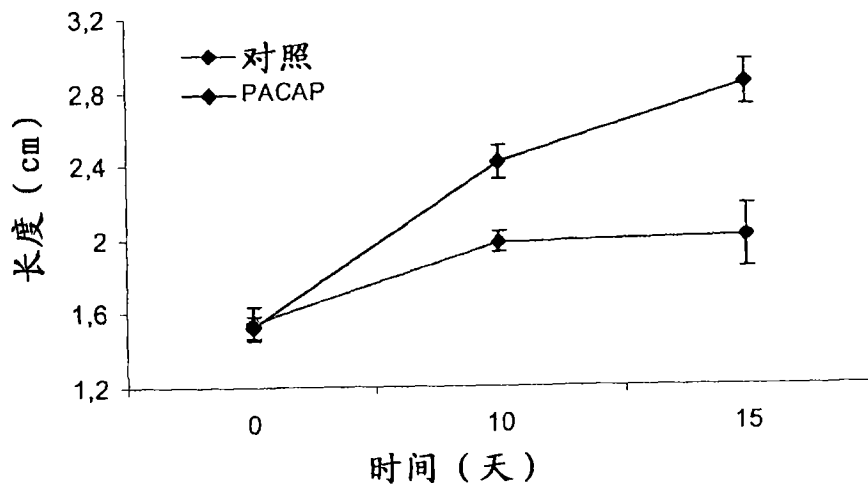


图 4B

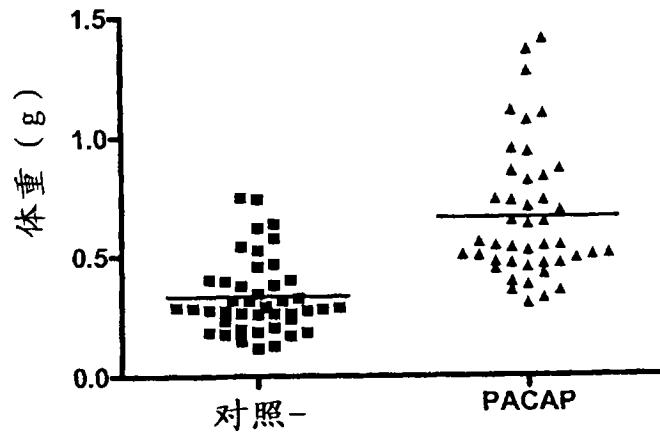


图 5

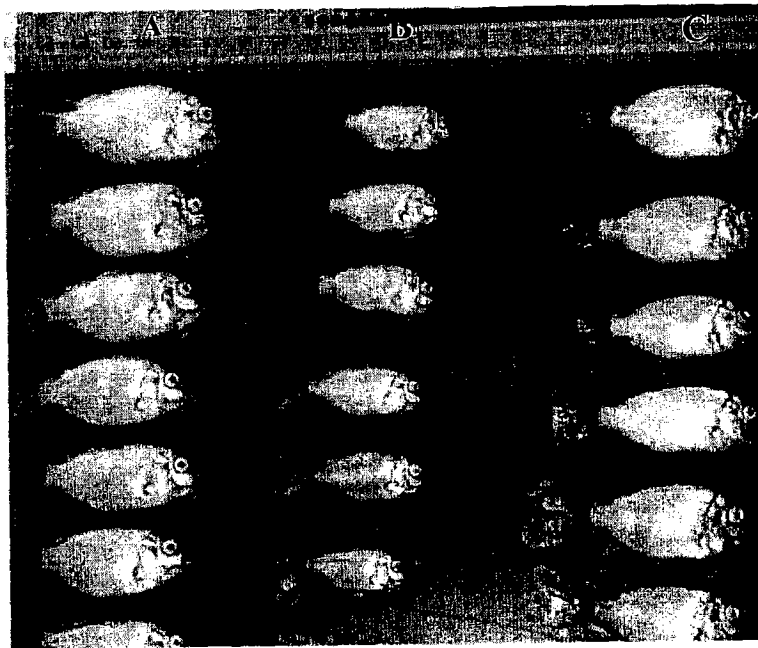


图 6

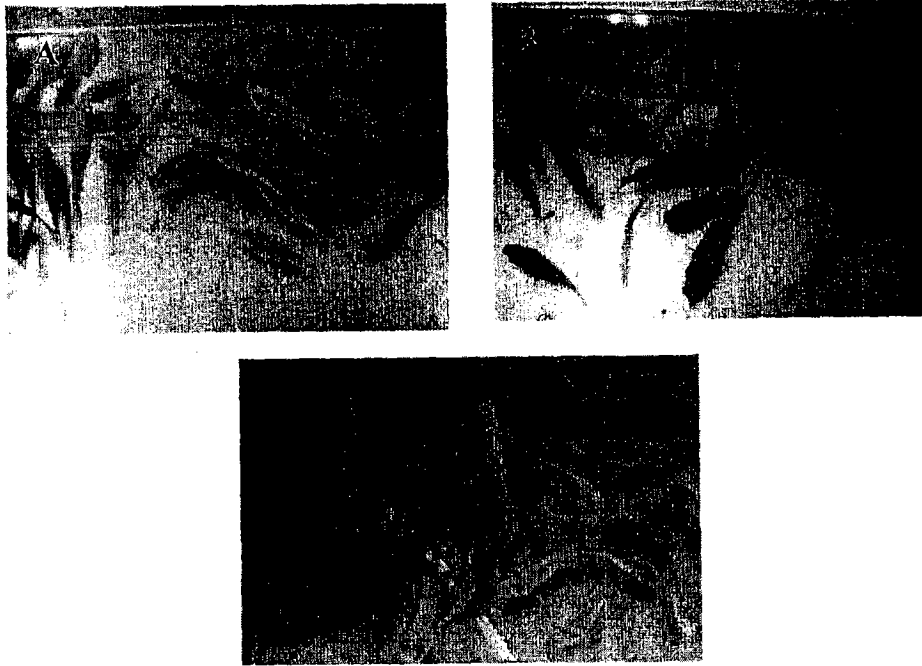


图 7

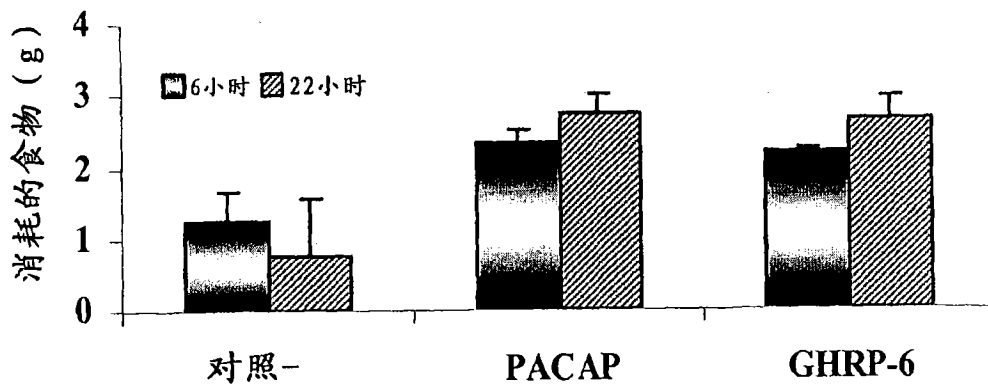


图 8