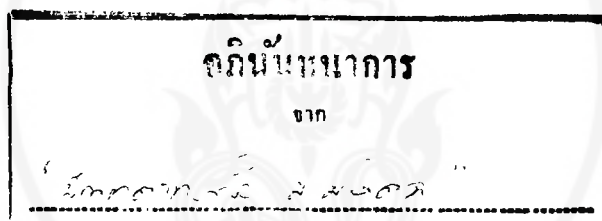


4 JAN 1994

**A HIGH LEVEL EXPRESSION OF
BIOLOGICALLY ACTIVE FISH GROWTH
HORMONE IN *Escherichia coli***

BOONHIANG PROMDONKOY



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)**

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1993

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลา ในปริมาณสูงจากเชื้อ
แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ผู้วิจัย บุญเฮียง พรหมคอนกอย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

บุรชัย สนธิยานนท์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 10 พฤศจิกายน พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

ปลาเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลานั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง อาทิเช่น พันธุ์ปลาที่ดี อาหาร การป้องกันและรักษาโรค และการจัดการฟาร์มที่ดี นอกจากนั้นแล้วอัตราการเจริญเติบโตของปลาหลังจากฟักเป็นตัวจนถึงขนาดที่ตลาดต้องการก็มีความสำคัญไม่น้อยเช่นกัน ถ้าสามารถทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วได้ จะทำให้ลดต้นทุนและระยะเวลาในการเลี้ยงได้เป็นอย่างมาก การใช้ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้

ปลาบึกเป็นปลาน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง แม้ว่าจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างก็ตาม ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของมัน ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งเช่นกัน แต่การที่จะสกัดเอาฮอร์โมนชนิดนี้จากต่อมใต้สมอง ของปลาบึกมาใช้โดยตรงนั้น นับว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยากซับซ้อน และได้ปริมาณน้อยประมาณ 1-4 มิลลิกรัมต่อต่อมใต้สมอง 1 กรัม ดังนั้นการนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการผลิตฮอร์โมนนี้ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

เนื่องจากเราได้มีผู้ทำการศึกษาและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน cDNA ของฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึก (*gcGH* cDNA) ไว้แล้ว ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มจำนวน *gcGH* cDNA ในหลอดทดลองโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่ออกแบบ

มาสำหรับให้ยีนนี้แสดงออกได้ใน *E. coli* หลังจากนำเอา *gcGH* cDNA ขึ้นต่อเข้ากับ พลาสมิดพาหะ (pUC12) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* พบว่าสามารถกระตุ้นเซลล์นี้ให้สร้าง โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20.5 kDa ซึ่งน่าจะเป็นฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของ ปลาบึก (*gcGH*) ได้สูงถึง 20 % ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ และสามารถแยกออกมาจากโปรตีน อื่นๆ ได้โดยทำให้เซลล์แตกแล้วทำการ centrifuge หลายๆ ครั้ง จากวิธีนี้สามารถผลิต ฮอร์โมนได้สูงถึง 40-60 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร และฮอร์โมนที่ได้จากวิธีการนี้มี ความบริสุทธิ์ถึง 94 % จากการทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตของฮอร์โมนที่ได้ จากวิธีนี้ โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อของปลาสวาย (*Pangasius sutchi*) และปลาทอง (*Carassius auratus*) พบว่าปลาทองที่ได้รับฮอร์โมน 0.1 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัมของ น้ำหนักตัวต่อสัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง และปลาทองที่ได้รับฮอร์โมน 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัมของ น้ำหนักตัวต่อสัปดาห์ จำนวน 8 ครั้ง มีการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ปลาทองที่ได้รับ ฮอร์โมน 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวต่อสัปดาห์ จำนวน 8 ครั้ง และปลาสวายที่ได้รับ ฮอร์โมน 0.1 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวต่อสัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง มีอัตราการ เจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และเมื่อฉีดฮอร์โมนในปริมาณที่สูงมาก (10 และ 100 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวต่อสัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง) เข้าสู่ปลาทอง พบว่าการเจริญเติบโตของปลาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด

จากข้อมูลเหล่านี้สามารถบอกได้ว่า ฮอร์โมนที่ได้จากวิธีนี้สามารถใช้เร่งการเจริญเติบโตของปลาทองและปลาอื่นๆ ได้ถ้าได้รับโดยวิธีการที่ถูกต้องและในปริมาณที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่างที่ควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ปริมาณฮอร์โมนที่เหมาะสม ในการให้แต่ละครั้ง วิธีการให้ฮอร์โมน จำนวนครั้งและความถี่ในการให้ฮอร์โมน ชนิดของปลา รวมทั้งช่วงอายุที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง เป็นต้น

Thesis Title A High Level Expression of Biologically Active
Fish Growth Hormone in *Eschericia coli*
Name Boonhiang Promdonkoy
Degree Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee
 Sakol Panyim, Ph.D.
 Burachai Sonthayanon, Ph.D.
Date of Graduation 10 November B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

Fish is an economically important animal of Thailand. The success of commercial aquaculture depends on many factors such as fish strains, food, disease control and management. Furthermore, the rate at which fish grow from egg state to market size state is an important component of the economics of commercial aquaculture. Use of fish growth hormone represents a potential solution to this problem.

Giant catfish (*Pangasianodon gigas*) is the biggest freshwater catfish in the world and its growth rate is considerably fast. This may be involved in the regulation of various factors, and its growth hormone has been believed to be an efficient agent to raise the fish growth rate. Since the hormone concentration in fish pituitary is very low (about 1-4 mg/g of pituitary gland), an efficient method for large-scale preparation has been sought. Recombinant DNA technique is considered the most effective one.

Giant catfish growth hormone cDNA (*gcGH* cDNA) encoding mature growth hormone had been amplified by polymerase chain reaction (PCR) with designed primers derived from *gcGH* cDNA previously cloned in a Bluescribe vector. The expression plasmid, pUC12-*gcGH*, was constructed

and transformed to *E. coli* JM107 to produce gcGH in a high level. The 20.5 kDa protein which corresponds to the putative mature gcGH was efficiently expressed in *E. coli* carrying the plasmid in which the gcGH cDNA was under control of LacZ promoter. This protein comprised about 20 % of total cellular proteins. Recombinant gcGH produced in *E. coli* was in a form of inclusion bodies with density higher than those of other cytosolic proteins which allowed isolation by centrifugation. The amount of gcGH obtained from this method was up to 40-60 mg/l of culture. The purity of partially purified gcGH is approximately 94 %. The test of biological activity of this hormone showed that the growth of goldfish (*Carassius auratus*) was accelerated when the partially purified gcGH was administered by 4 intramuscular injections, at a dose of 0.1 and 1.0 ug/g body weight/week, and by 8 intramuscular injections only a dose of 0.1 ug/g body weight/week. But it did not raise the significant growth of catfish (*Pangasius sutchi*) when the hormone was administered by 4 intramuscular injections at a dose of 0.1 and 1.0 ug/g body weight/week. In addition, the growth of goldfish which received 4 intramuscular injections of very high dose (10 and 100 ug/g body weight/week) was not different from control group. This suggests that the recombinant gcGH can be used to increase growth rate of other fish species if it was administered with a suitable dose. However, a number of parameters must be addressed before its use, such as the route, the dose and the frequency of delivering hormone to the fish, including the kind of fish and its age.