

鸡缩胆囊素 -33 串联体的构建、原核表达

及免疫原性研究

舒鼎铭, 覃健萍, 曹永长, 毕英佐

(华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642)

摘要: 根据鸡缩胆囊素 (choleystokinin, cck)-33 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子, 设计了大肠杆菌表达系统偏爱的 cck 基因序列. 将 cck-33 基因克隆至 pRsET A 质粒上, 利用载体上的同尾酶构建 cck 基因四串联体并在大肠杆菌 E coli BL 21 中成功表达. 将所表达的融合蛋白进行纯化后, 以纯化的蛋白为免疫原制备油佐剂疫苗主动免疫胡须肉鸡. 结果表明, CCK 蛋白主动免疫肉鸡后, 抗血清水平显著升高, P/N 值远远大于 2.

关键词: 缩胆囊素; 串联体; 原核表达; 免疫原性

中图分类号: S856. 65 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)02-0096-04

Studies on the Construction, Expression and Immunogenicity of

Chicken Choleystokinin-33 Concatemer

SHU Ding-ming, QIN Jian-ping, CAO Yong-chang, BI Ying-zuo

(College of Animal Science, South China Agric. Univ. , Guangzhou 510642, China)

Abstract: The choleystokinin-33 (cck-33) gene was synthesized based on the chicken (cck-33) sequence and E. coli codon bias. The cck-33 gene was inserted into plasmids pRSET A and its concatemer was constructed based on the fact that isocaudarmer enzyme existed. The recombinant CCK protein was expressed in E. coli BL 21 and purified successfully. The purified protein was used as an antigen to prepare oil-emulsion vaccines and then to immunize Huxu chicken. The result indicated that the anti-serum P/N of chicken immunized with purified protein was higher than 2.

Key words: choleystokinin ; concatemer; prokaryotic expression ; immunogenicity

在现代高度集约化的生产条件下, 动物采食量不足已成为一个普遍现象, 若能提高动物的生产性能, 首要的也是最有效的方法就是提高动物的采食量. 因此提高动物采食量的研究就显得十分重要. 缩胆囊素 (CCK) 是一种调节动物采食量的有效因子, 属多肽类激素. 许多研究表明, CCK 是一种饱感因子, 是一个重要的“饱中枢兴奋”信号^[1-3], 能够抑制胃排空^[4]. CCK 前体为 130 个氨基酸, 逐步分解成为小分子的 CCK, 目前发现的 CCK 有 CCK-83, CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-12, CCK-8 和 CCK-4. 其中以 CCK-33 和 CCK-8 为主要形式^[5]. 自从 1973 年 Gibbs 等首次报道 CCK 可以抑制大鼠采食以来, 已

经有许多研究证实, CCK 可以降低动物的采食量^[6-7]. 鉴于 CCK 具有抑制采食的特性, 本研究根据 GenBank 中已发表的 cck-33 基因的碱基序列和大肠杆菌高频密码子合成 cck-33 基因, 构建 cck-33 基因四串联体进行表达, 并以此为免疫原主动免疫动物, 研究 CCK 蛋白的免疫原性, 为下一步的研究工作奠定基础.

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

pRSET A 质粒与菌株 *E. coli* DH 5 α 、BL-21 为华南农业大学基因工程实验室保存.

收稿日期: 2005-07-08

作者简介: 舒鼎铭, 男 (1968-), 研究员, 博士; 通讯作者: 毕英佐, 男 (1944-), 研究员, E-mail: yzbi@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目 (04205804)

1.2 血清及试验动物

CCK 阳性血清购自 Sigma 公司,羊抗兔 IgG 购自华美公司。

岭南黄胡须鸡 E2 系母鸡购自广东省农业科学院畜牧研究所。

1.3 酶类及其他试剂

Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTPs(2.5 mmol/L each)、DNA marker DL2000 均为 TaKaRa 产品;E. Z. N. A. Plasmid Minipreps Kit 和 E. Z. N. A. Gel Extraction Kit 均为 Omega 产品;L 预染色的蛋白质相对分子质量标准 Bio-Rad 产品;硝酸纤维素膜购自基因公司.CCK-8 抗体购自 Sigma 公司。

1.4 鸡 cck 基因的设计与合成

根据 GenBank 的鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子,设计合成 cck-33 基因。

1.5 cck-33 基因四串联体的构建

根据人工合成的 cck 基因设计特异性引物 C1: 5'-CATGGATCCGGTTCTACTGGCCGCT-3' (含 *Bam*HI 酶切位点)、C2: 5'-CATGAGCTCCCAAAATCCATC-CAGCC-3' (含 *Sac*I 酶切位点)扩增 cck-33 基因片段。将其连接至 pRSET A 质粒,转化 DH 5 α ,获得重组质粒 pRSET-1CCK,质粒用 2 组酶酶切:第 1 组用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行双酶切,回收小片段;第 2 组用 *Bgl* II 和 *Hind*III 进行双酶切,回收大片段。将 2 个片段进行连接,获得重组质粒 pRSET-2CCK,采用同样的方法,以 pRSET-2CCK 为基础构建重组质粒 pRSET-4CCK,进行 PCR 鉴定和序列测序。

1.6 cck-33 基因四串联体的诱导表达及检测

将经测序鉴定的 pRSET-4CCK 转化 *E. coli* BL 21,挑选阳性菌种在含 Amp 的 LB 液体培养基中培养至 $D_{600\text{nm}}$ 值达 0.5 左右时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,分别在加入 IPTG 后 0、1、2、3、4 h 取菌液,用 SDS-PAGE 进行鉴定。用 CCK 阳性血清按照汪家政等^[8]的方法对表达的融合蛋白进行 Western-blot 分析。

1.7 融合蛋白的纯化

将诱导表达的菌体收集后,于冰浴上进行超声破碎、离心后,沉淀用 8 mol/L 的尿素进行溶解。用纯化树脂 50% (体积分数) Ni-NTA 在变性条件下进行纯化。

1.8 动物免疫

将纯化的融合蛋白制成高、低剂量 2 种油佐剂疫苗,蛋白质量浓度分别为 1.0、0.5 mg/mL。将 360 只 20 日龄的胡须鸡 E2 系母鸡随机分成 3 组,每组 3 个重复,每个重复 40 只鸡,第 1 组为对照组,第 2 组

为主动免疫高剂量疫苗,第 3 组为主动免疫低剂量疫苗。免疫方式为肌肉注射。20 日龄免疫第 1 次,剂量为 0.2 mL/只,以后每隔 20 d 免疫 1 次,第 2 次免疫的剂量为 0.4 mL/只,第 3 次免疫的剂量为 0.6 mL/只,共免疫 3 次。称体质量并统计采食量,计算料肉比。

1.9 血液样品的采集及测定

分别于注射疫苗前(20 日龄)、35、55 及 90 日龄,每组随机取 30 只鸡采血制备血清,用自己建立的 ELISA 法测定抗体水平。

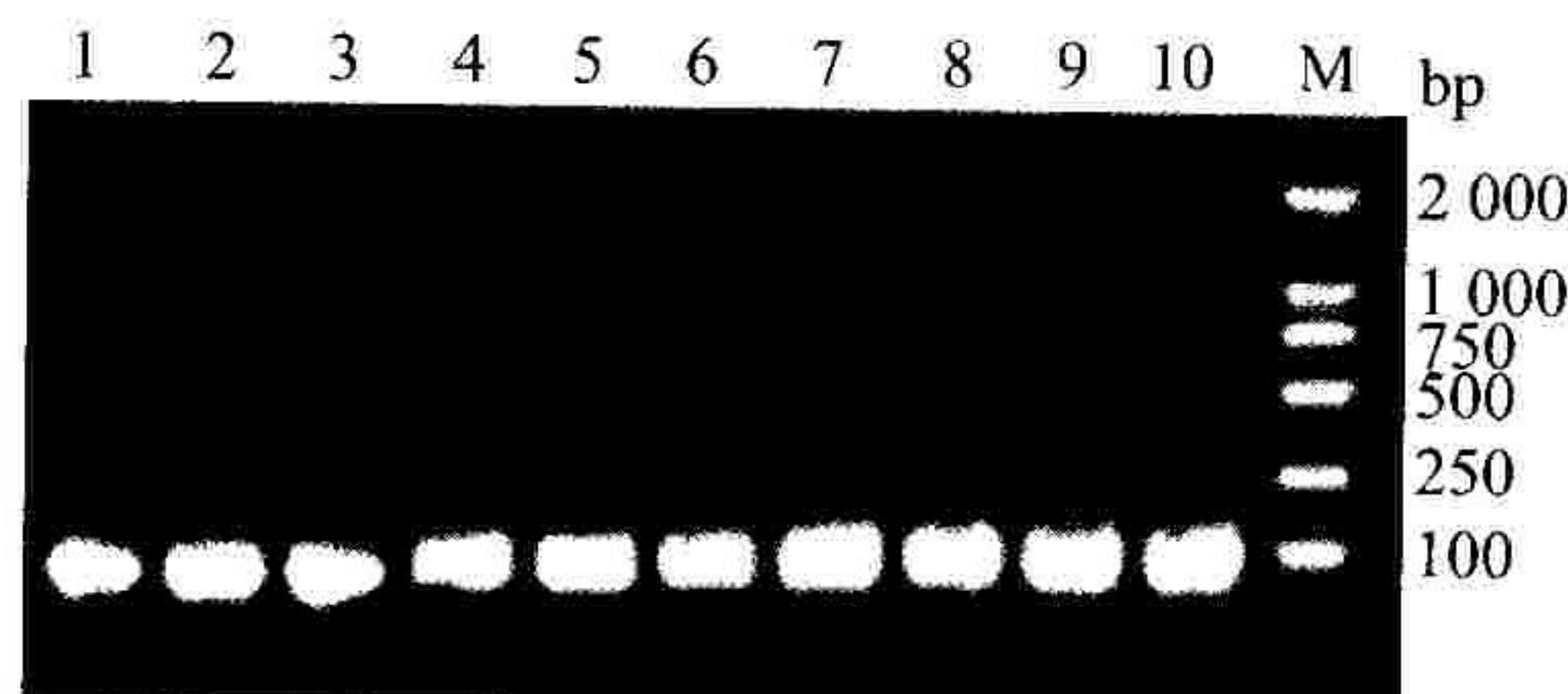
1.10 数据统计

试验数据采用 SPSS(11.5) 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 cck-33 基因的合成及四串联体的构建

合成后的 cck 基因大小约 120 bp,单个基因表达的蛋白质的相对分子质量约为 7 300 (包括融合蛋白相对分子质量约为 3 000) 经序列测定,结果与预期的一致。根据合成的基因序列设计引物 C1、C2 扩增 cck-33 基因片段。用 *Bam*HI 和 *Sac*I 对 cck-33 基因片段和 pRSETA 质粒进行酶切、连接,连接产物转化 DH5 α 受体菌并经 AMP 筛选后,挑取阳性菌落培养,以菌液为模板进行 PCR 检测,结果见图 1。从图中可看到扩增的片段大小约为 120 bp,与预期的相符。将获得的阳性重组质粒命名为 pRSET-1CCK。



M:DNA marker DL2000;1~10:重组质粒 pRSET-1 CCK 的 PCR 鉴定

M:DNA marker DL2000;1-10:PCR amplification of recombinant plasmids pRSET-1 CCK

图 1 重组质粒 pRSET-1 CCK 的 PCR 鉴定

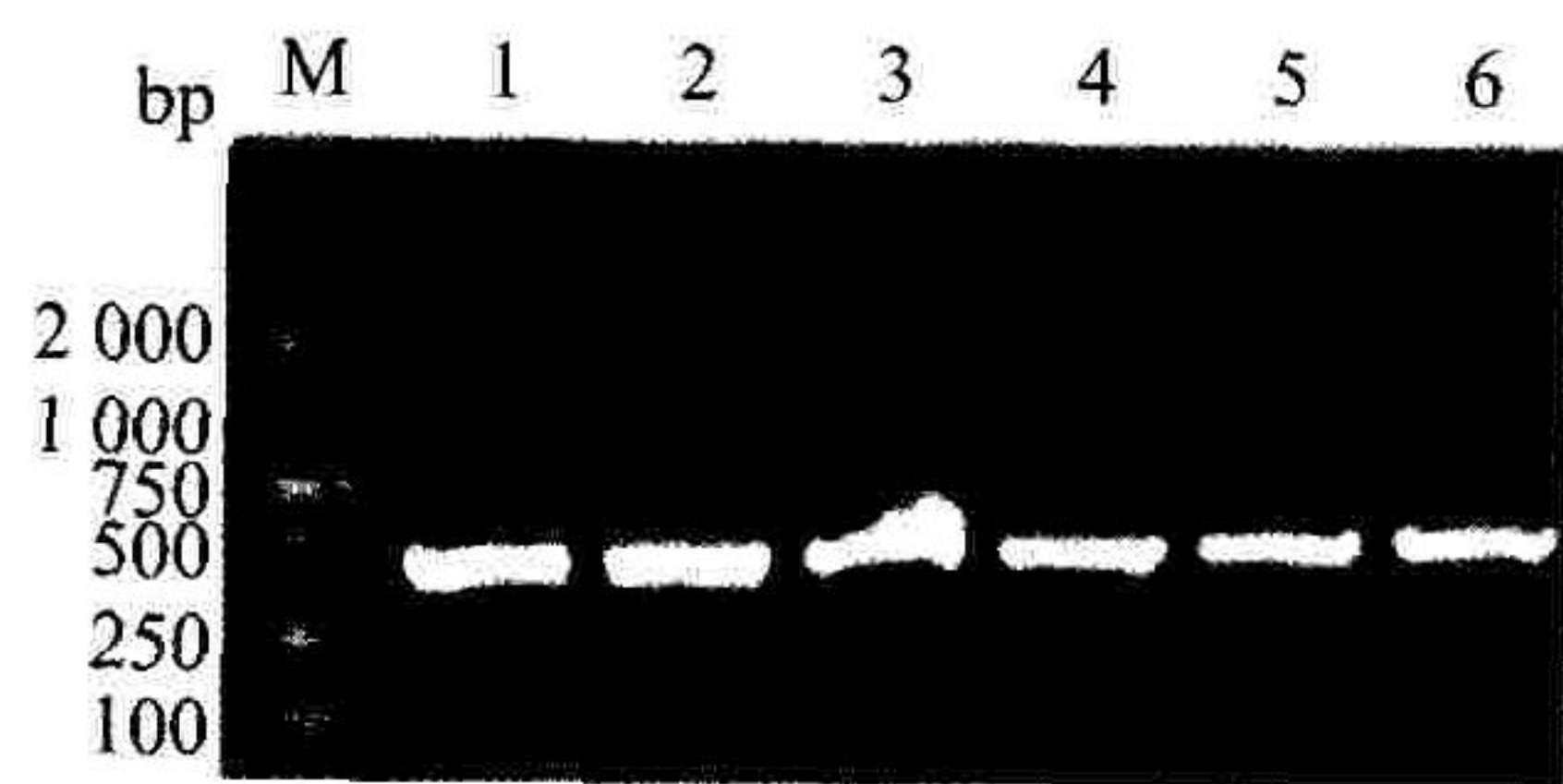
Fig. 1 PCR amplification of recombinant plasmids pRSET-1 CCK

含 cck-33 基因四串联体的重组质粒 pRSET-4CCK 的 PCR 鉴定结果如图 2,PCR 产物大小约为 500 bp,与预期的相符。DNA 序列测定结果表明,cck-33 基因四串联体的序列与设计相符,读码框也正确。

2.2 cck-33 基因四串联体的表达及检测

采用不同的诱导表达时间对 cck-33 基因四串联体的表达条件进行优化,SDS-PAGE 结果如图 3 所示,在 1.0 μ g/mL 的 IPTG 诱导下,CCK-33 肽四串联体的融合蛋白成功表达,相对分子质量约为 21 000,与预期的结果一致,在诱导 1 h 后表达量还

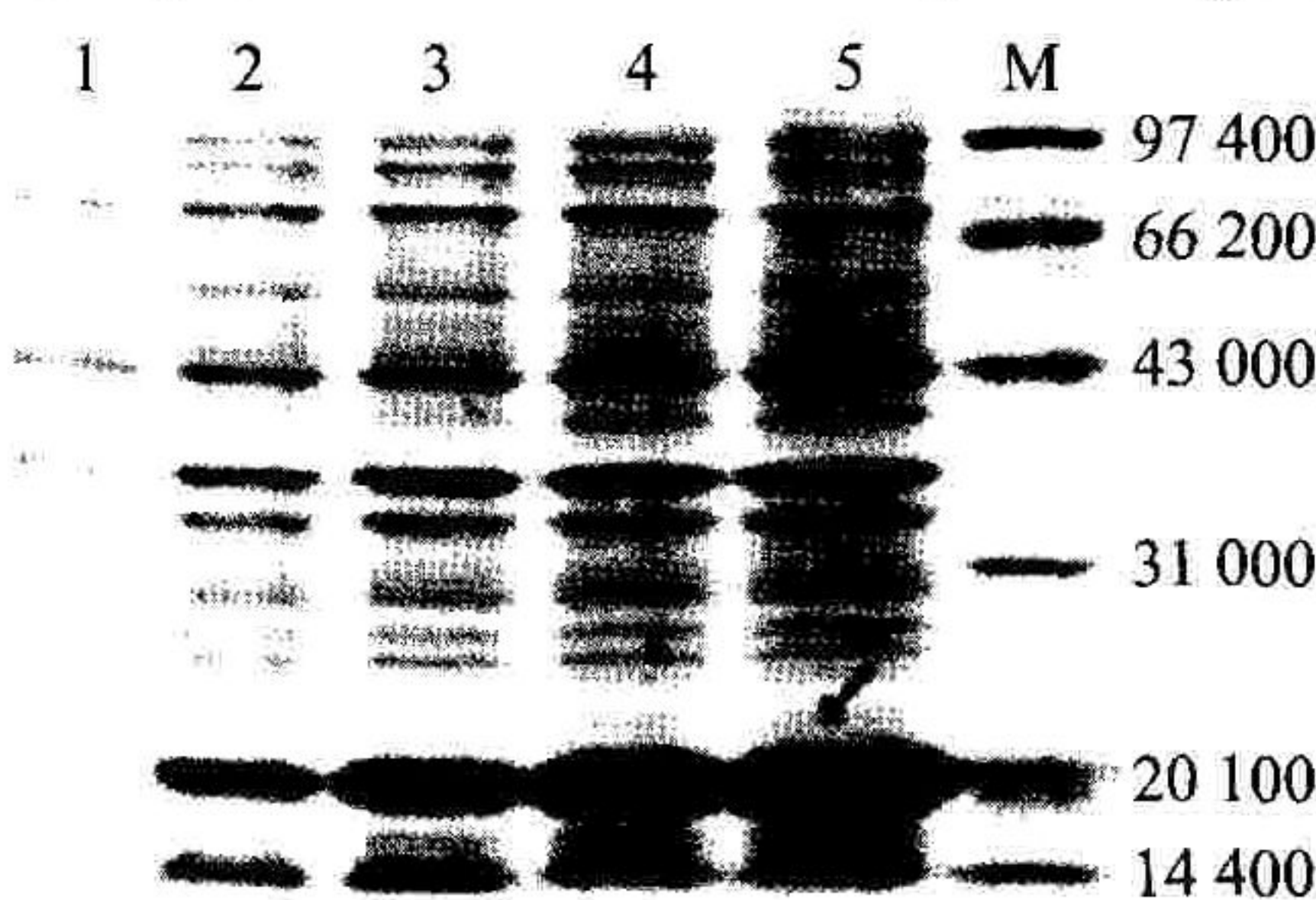
很低,随着时间的延长,表达量逐步升高,3 h 后趋于稳定.用 VL 凝胶成像系统 BioID ++ 程序对电泳结果扫描分析表明,在最高表达量时,目的蛋白含量占总蛋白含量的 25.8%.



M:DNA marker DL2000;1~6:pRSET-4CCK 重组质粒的 PCR 产物
M:DNA marker DL2000;1-6:PCR amplification of recombinant plasmids pRSET-4CCK

图2 重组质粒 pRSET-4CCK 的 PCR 结果

Fig. 2 PCR amplification of recombinant plasmids pRSET-4CCK



M:蛋白质相对分子质量标准;1~5:在 IPTG 诱导下的细菌裂解物,诱导时间分别是 0、1、2、3 和 4 h
M:protein relative molecular mass (standards); 1-5: expression products of *E. coli* containing recombinant plasmids induced for 0, 1, 2, 3, 4 h, respectively

图3 不同时间表达的 CCK-33 肽四串联体的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of 4CCK in different time

2.3 融合蛋白的纯化、鉴定及 Western-blot 检测

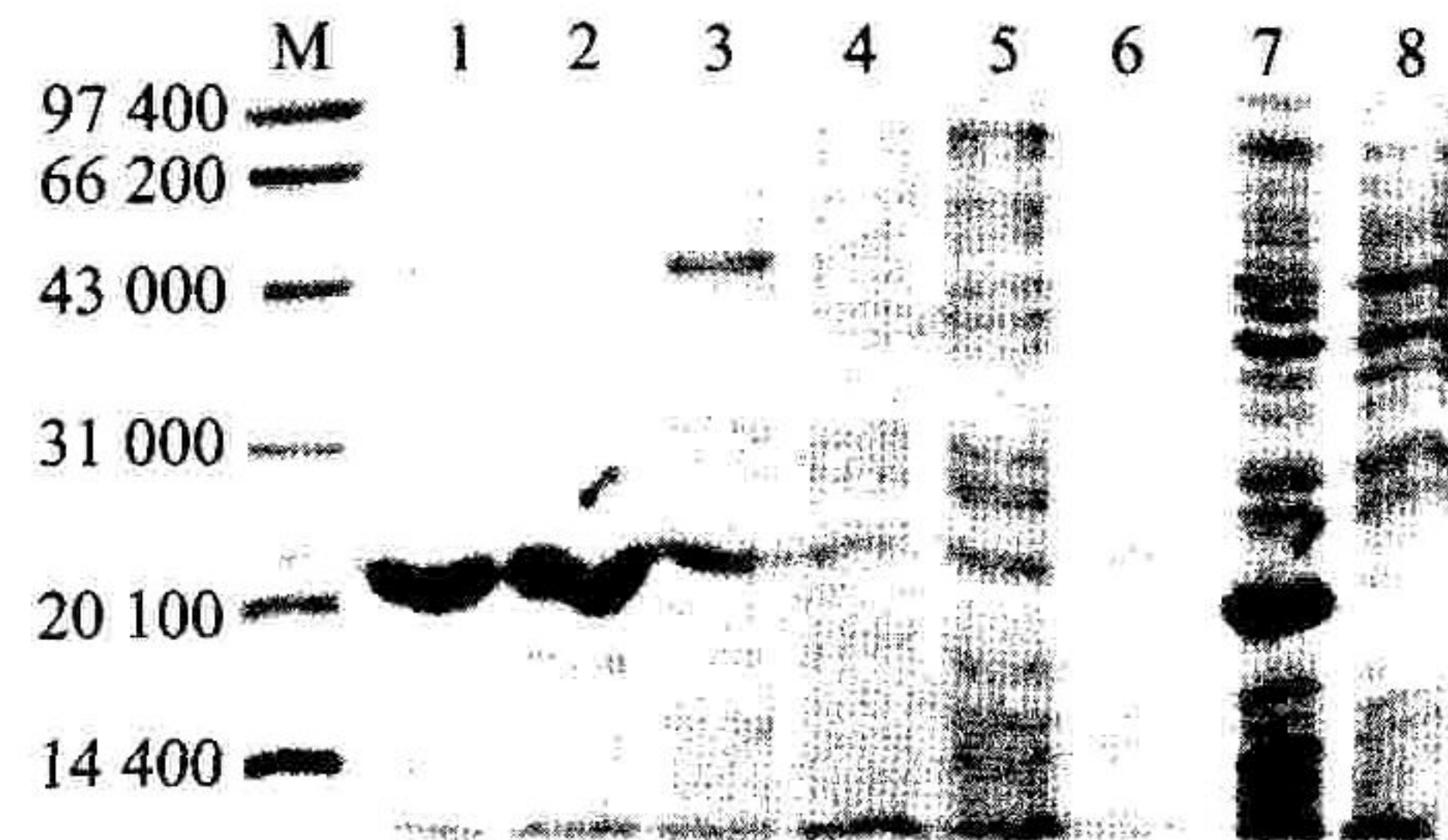
收集少量表达菌经超声破碎后进行可溶性分析,结果表明表达菌大部分以包涵体形式存在.将表达菌离心沉淀的菌体在裂解液作用 30 min 后,在冰浴中进行超声破碎,取上清液用 6 × His-Tag 融合蛋白纯化树脂 50% (体积分数) Ni-NTA 纯化,依次收集洗脱液 B、C、D、E 进行 SDS-PAGE 分析,结果表明在 8 mol/L 尿素洗脱液 E 中有比较纯的表达蛋白,如图 4 所示.

融合蛋白的 Western-blot 检测结果(见图 5)可看出,CCK-33 肽四串联体表达产物能与抗体特异性结合,表明所表达的产特是正确的.

2.4 动物免疫试验

采用 ELISA 方法测定血清中抗 CCK 抗体的水平,注射疫苗前,3 个组的抗体水平基本一致, P/N 约 1.164. 注射疫苗后,分别在 35、55、90 日龄采血测定抗体水平,结果见表 1. 从表 1 中可以看出,3 次测定

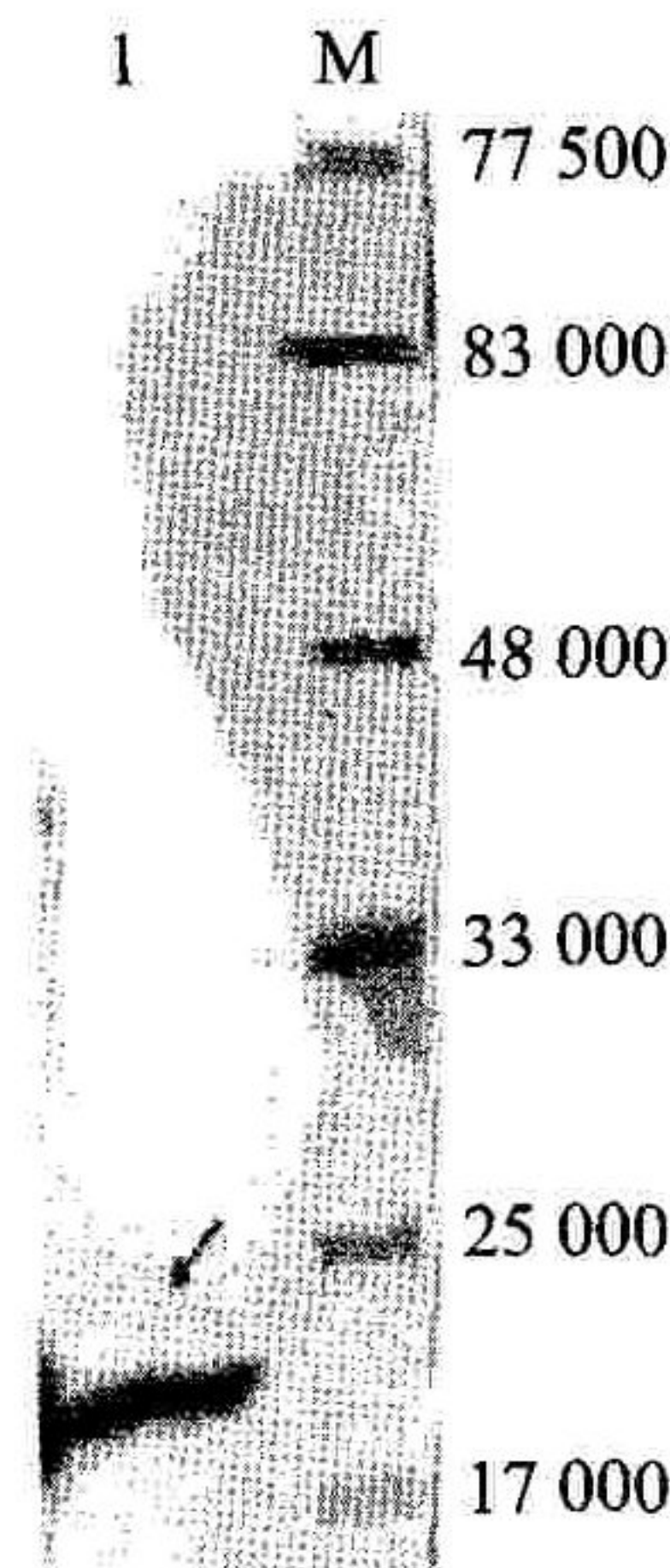
试验组抗体的 P/N 值均大于 2,参照吕文发等^[9]的方法(P/N 值 > 2 为阳性). 据此可判断本试验所制备的抗血清为阳性,表明主动免疫 CCK 在鸡体内产生了抗体,且明显高于对照组($P < 0.05$).



M:蛋白质相对分子质量标准;1,2:洗脱液 E;3,4:洗脱液 D 和 C;5,6:洗脱液 B;7:4CCK 肽四串联体融合;8:空质粒对照.
M:protein relative molecular mass(standards); 1, 2:elution buffer E; 3, 4:wash buffer D and C; 5, 6:lysis buffer B; 7:4CCK expression products; 8:expression products of *E. coli* without 4CCK gene

图4 CCK-33 肽四串联体融合蛋白纯化后的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein



M:预染的蛋白相对分子质量标准;
1:CCK-33肽四串联体表达产物
M:prestained protein relative molecular mass standards;1:4CCK expressed products

图5 CCK-33 肽四串联体表达产物的 Western-blot 检测

Fig. 5 Western-blot analysis of 4CCK expressed products

表1 免疫后的鸡抗血清 ELISA 检测结果 (P/N)¹⁾

Tab. 1 Detection of chicken antiserum after immunization by ELISA (P/N) n = 30

组别 group	测定日龄 testing days/d		
	35	55	90
对照组 control group	1.350 ± 0.016b	1.566 ± 0.045b	1.568 ± 0.045b
低剂量组 low dosage group	2.022 ± 0.143a	2.553 ± 0.150a	2.606 ± 0.108a
高剂量组 high dosage group	2.181 ± 0.137a	2.761 ± 0.191a	2.675 ± 0.089a

1) 同列数据后,不同字母者为差异显著 ($P < 0.05$, SPSS 法)

表 2 为 CCK-33 肽四串联体主动免疫鸡后体质量及采食量等各指标的变化情况. 从表 2 中可以看出,低剂量组、高剂量组的体增质量均明显高于对照

组($P < 0.05$),高剂量组的采食量明显高于对照组($P > 0.05$).料肉比均有所下降,其中以低剂量组($P < 0.05$),低剂量组的也高于对照组,但差异不显著($P > 0.05$).

表2 各试验组的体质量、采食量和料肉比¹⁾

Tab. 2 The body mass, feed intake and feed efficiency of every group

n = 120

组别 group	体增质量 mass gain/(g · 只 ⁻¹)	采食量 feed intake/(g · 只 ⁻¹)	料肉比 feed meat ratio
对照组 control group	808.64 ± 12.80b	3 031.62 ± 71.34b	3.75 ± 0.03a
低剂量组 low dosage group	849.86 ± 36.81a	3 062.91 ± 79.88ab	3.61 ± 0.08b
高剂量组 high dosage group	861.43 ± 23.80a	3 129.05 ± 45.9a	3.63 ± 0.13ab

1) 同列间数据后不同字母者为差异显著($P < 0.05$, SPSS 法)

3 讨论

CCK 在动物体内主要以羟基端酰胺化的 CCK-8 和 CCK-33 的形式存在. 由于 CCK-8 的相对分子质量太小, 所以本研究选用大肠杆菌偏爱的密码子设计 cck-33 基因进行研究. 试验证明, 利用人工合成的基因进行表达, 表达量非常高, 免疫原性蛋白表达最高占细菌总蛋白含量的 34.6% 左右. 经 Western-blotting 证明表达产物具有反应原性. 本研究除了设计高表达基因外, 还将 cck-33 基因进行串联, 获得四串联体, 以增强其免疫原性. 经 PCR 和序列测定表明, 本研究构建的四串联体重组质粒是正确的, 阅读框也正确. 以往构建基因串联体多采用随机串联的方式^[10]. 此种方法的缺点是: 偶然性很强, 无法人为控制串联体的大小, 且往往最终得不到串联体. 与之相比, 本研究根据所选表达质粒 pRSET A 的结构及限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Bgl*II 是同尾酶的原理来构建串联体. 此种方法可以人为地控制串联体的大小. 由于不完全直接对目的基因本身进行酶切和连接, 而是借助于载体上的酶切位点将目的基因片段连在载体 DNA 大片段上来进行串联体的构建, 这样既克服了某些小肽因基因过小, 难以进行重组操作的困难, 又省却了许多繁琐的步骤, 用 PCR 方法进行鉴定时也更容易些. 将重组质粒 pRSET-4CCK 转入大肠杆菌中进行表达, 在相对分子质量 21 000 处有目的蛋白出现, 与预期的结果一致. 用 VL 凝胶成像系统 BioID + + 程序进一步对电泳结果扫描分析, CCK-33 肽四串联体融合蛋白最高占细菌总蛋白的 25.8%.

Pekas 和 Trout^[6] 采用 CCK 免疫生长猪, 抗体水平显著升高, 采食量和增质量分别提高 8.2% 和 10.6%. 本试验免疫后鸡的采食量及体质量均有所增加, 与上述的结果类似. Della 等^[2] 将 CCK 抗体注入羊脑脊液中, 血清中抗体水平显著升高. 本试验通过对所采集的血清进行 ELISA 测定结果表明, 主动免疫 CCK 在肉鸡体内能够产生抗体, 3 次免疫后的

血清 ELISA 检测的 P/N 值 > 2 , 说明主动免疫 CCK-33 肽四串联体纯化蛋白疫苗可在鸡体内产生抗体, 具有良好的免疫原性.

参考文献:

- [1] DELLA-FERA M A, BAILE C A. Cholecystokinin octapeptide: Continuous picoMe injections into the cerebral ventricles suppress feeding [J]. Science, 1979, 206: 471-473.
- [2] DELLA-FERA M A, BAILE C A, ET A L. Cholecystokinin antibody injected in cerebral ventricles stimulates feeding in sheep [J]. Science, 1981, 212: 687-689.
- [3] MCLAUGHIN C L, BAILE C A. Decreased sensitivity of zucker obese rata to the putative satiety agent cholecystokinin [J]. Physiol Behav, 1980, 25: 543-548.
- [4] LERAY V, SEGAIN J P, CHERBUT C, et al. Adaptation to low-protein diet increases inhibition of gastric emptying by CCK [J]. Peptides, 2003, 24(12): 1 929-1 934.
- [5] WALSH J H. Gastrointestinal hormones in physiology of the gastrointestinal tract [M]. New York: Raven Press, 1987: 195-206.
- [6] PEKAS J C, TROUT W E. Stimulation of food intake and growth of swine by cholecystokinin immunization [J]. Growth Dev Aging, 1990, 54: 51-53.
- [7] DREWE J, GADIENT A, ROVAATI L C, et al. Role of circulating cholecystokinin in control of fat-induced inhibition of food intake in human [J]. Gastroenterology, 1992, 102: 1 654-1 659.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 166-183.
- [9] 吕文发, 赵静, 卢广林, 等. 猪肌生长抑制素 C 端 88 氨基酸肽抗体制备 [J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(3): 332-334.
- [10] 王霞, 彭晓东, 黎光, 等. 抗人核内不均一核糖核蛋白 A2B1 抗体可变区基因克隆、串联和表达 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, 21(6): 548-552.

【责任编辑 柴 焰】