

重组缩胆囊素融合蛋白制备及其免疫原性研究

刘洁珠^{1,2}, 毕英佐¹, 薛春宜³, 曹永长^{1,3}

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 佛山科学技术学院 环境与土木建筑学院, 广东 佛山 528000; 3 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:成功扩增了猪缩胆囊素(CCK)基因C末端片段,并在大肠杆菌中成功表达,SDS-PAGE检测到相对分子质量约为45 000的融合蛋白,最高表达量占菌体总蛋白的40.21%,蛋白可溶性分析表明,融合蛋白主要是以可溶性形式表达。Western-blotting证实,可溶表达的融合蛋白能与CCK-8阳性血清具有良好的免疫反应性。以纯化后的蛋白为免疫原制备油乳剂疫苗免疫蛋鸡,结果表明,CCK蛋白可在鸡体内引起免疫反应,加强免疫后蛋鸡血清和卵黄中CCK抗体可维持在较高水平。为了研究含有CCK抗体的蛋黄粉对鸡生长性能的影响,将其作为添加剂饲喂20日龄肉鸡,试验结果表明,饲喂添加100和300 g/t含CCK抗体蛋黄粉的肉鸡与阴性对照组相比,试验全期体增质量分别提高2.34%、3.80%,采食量分别提高0.91%、2.65%,且对饲料体增质量比无显著影响。

关键词:缩胆囊素; 克隆; 高效可溶表达; 卵黄抗体; 生长性能

中图分类号:S856.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0070-05

Preparation of the Recombinant Fusion Protein of Cholecystokinin and Its Immunogenicity

LIU Jie-zhu^{1,2}, BI Ying-zuo¹, XUE Chun-yi³, CAO Yong-chang^{1,3}

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Environment & Construction, Foshan University, Foshan 528000, China;

3 College of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The C-terminal fragment of cholecystokinin (CCK) gene was successfully amplified and expressed in *E. coli* BL21. SDS-PAGE analysis showed that the peak expression level of the fusion protein with relative molecular mass of 45 000 accounted for 40.21% of the total bacterial protein. Solubility analysis demonstrated that the majority of fusion proteins were expressed as soluble form. Western-blotting showed that the expression products specifically reacted with the antisera of CCK-8. After purification, the soluble fusion proteins were used to prepare oil-emulsion vaccines. The laying hens were immunized. ELISA results indicated that the vaccines can result in immune response, and the CCK antibody levels in serum and yolk maintained a high level after booster injection. 20-day old broilers were used to examine the effects of dried yolk powder containing CCK antibodies on growth performance. The feeding trials showed that supplementation of yolk powder containing CCK antibodies at the dosage of 100 g/t in feed caused mass gains and feed intake to increase by 2.34% and 0.91%; while that of 3.80% and 2.65% at the dosage of 300 g/t, respectively. Furthermore, there was no difference in feed efficiency between the treatment groups and the control group.

Key words: cholecystokinin; clone; high soluble expression; yolk antibody; growth performance

收稿日期:2008-06-26

作者简介:刘洁珠(1981—),女,硕士; 通讯作者:曹永长(1965—),男,教授, E-mail: caoych@mail.sysu.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2006A20403002);广东省自然科学基金团队项目(04205804)

缩胆囊素(cholecystokinin, CCK)是小肠近端 I 细胞和中枢神经细胞分泌的一种脑肠肽,具有刺激胰酶分泌和胆囊收缩、降低胃排空、促进胰岛中胰岛素和生长抑素释放等作用,同时 CCK 也是动物体内的一种饱感因子,参与调节动物的采食^[1-2]。研究表明,内源 CCK 抑制采食的作用可用免疫中和的方法来部分消除而提高动物的采食量^[3]。目前,用 CCK 主动免疫动物来提高其生产性能的研究通常都选择用人工合成的 CCK-8 作为抗原,由于 CCK-8 相对分子质量较小,属于半抗原,需要与一定的载体交联形成全抗原,操作不便且价格昂贵^[4-5];或利用分子生物学技术制备,但制备的 CCK 融合蛋白通常以不溶的包涵体存在,需要经过变性纯化和复性后才具生物活性,操作繁琐且复性过程容易降解,不利于大量制备^[6-7]。本研究针对 CCK 研究中存在的问题,利用分子生物学技术,制备大量价格低廉且反应性良好的 CCK 可溶蛋白。并将制备的蛋白作为抗原制备抗 CCK 卵黄抗体以中和动物内源 CCK,提高采食量、促畜禽生长。这在禁止使用抗生素和激素作为生长促进剂的当今,对畜牧业生产具有重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验动物、菌种和质粒

试验动物选用 32 周龄褐壳蛋鸡、20 日龄肉鸡。*E. coli* BL21、*E. coli* DH5 α 由华南农业大学基因工程实验室保存;质粒 pBCX 由华南农业大学谢青梅博士构建^[8],华南农业大学基因工程实验室保存。

1.2 主要试剂

反转录酶、RNA 酶抑制剂、ExTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 均为 TaKaRa 公司产品;RNA 抽提试剂盒为 Invitrogen 公司产品;DNA 凝胶快速回收试剂盒及质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品;6 $\times$ His 蛋白质纯化树脂为 Qiagen 公司产品;CCK-8 肽、兔抗 CCK-8 阳性血清为 Sigma 公司产品;山羊抗兔 IgG-HRP、兔抗鸡 IgG-HRP、底物 TMB 为百奥公司产品。

1.3 引物设计

参照 GenBank 中注册的猪 CCK 基因序列(序列号为:K01940)设计 1 对引物,即 CCKup/CCKdn。理论跨幅 210 bp,包括猪 CCK 基因活性片段。在引物 5'端加上 *Bam*HI 酶切位点,3'端加上 *Xho*I 酶切位点,并用下划线表示。引物由赛百盛公司合成。引物序列如下:

CCKup: 5'-TTAGGATCCGCGGTGCAAAAGGTAGAC-

3';

CCKdn: 5'-ATTCTCGAGGGAGGTATATTCATATCTC-3'.

1.4 猪 CCK 基因片段克隆及重组表达质粒的构建

按 RNA 提取试剂盒使用说明书抽提猪脑组织总 RNA。以 CCKup/CCKdn 为引物,RT-PCR 扩增 CCK 基因片段,RT 产物直接用于 PCR 扩增。PCR 条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将加尾后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。筛选后取样送上海博亚生物工程公司测序。以测序正确的重组质粒为模板,按上述 PCR 条件扩增、检测目的片段。再将经 *Bam*HI、*Xho*I 消化的 CCK 基因片段与消化的 pBCX 质粒片段连接后转化 DH5 α 感受态细胞,再将转化子进行筛选鉴定。

1.5 重组质粒在大肠杆菌中的可溶性表达

将阳性重组质粒转化 *E. coli* BL21,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 进行诱导,分别在 0、1、2、3、4、5 h 取样检测表达产物;并取表达量最大的表达产物进行可溶性分析。在细菌沉淀中加入 500 μ L 的裂解缓冲液,于冰浴中超声破碎,超声时间 8 s,间隔时间 8 s,功率 400 W 破碎 30 次。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液和沉淀处理后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6 表达产物的纯化与定量

按照 Qiagen 公司纯化树脂 Ni-NTA 说明书的方法进行操作。再以牛血清白蛋白为对照绘制标准曲线,将纯化后的蛋白略微浓缩后用 Bradford 的方法测定蛋白浓度。

1.7 CCK 融合蛋白的 Western-blotting 分析

用 SDS-PAGE 检测目的蛋白,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。安装转移夹,50 mA 转移 1.5 h,再用质量分数 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。Western-blotting 所用一抗为兔抗 CCK-8 阳性血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG,DAB 显色,待 NC 膜上出现棕红色条带时取出并记录结果。

1.8 蛋鸡免疫及血液、蛋黄样品的采集与测定

将融合蛋白制成浓度为 0.5 mg/mL 的油乳剂疫苗。选用 32 周龄健康褐壳蛋鸡 64 只,随机分为 2 个组,每组 32 只。第 1 组为空白对照组,第 2 组为主动免疫重组疫苗组。分组后开始注射疫苗,每次免疫 1 mL/只,每 20 d 免疫 1 次,共免疫 3 次。分别于免疫前 1 d、每次免疫后 8 d 和试验第 94 d 上午每组随机抽取 10 只采血和收集鸡蛋制备血清样及蛋黄样;

制备的阳性和阴性血清样及蛋黄样用经超声波破碎的大肠杆菌吸附处理后,用自己建立的 ELISA 法测定抗体水平,测定抗原为自制的高纯度融合蛋白 4CCK-33. 再将 CCK 抗体处于恒定水平的鸡蛋收集后分离蛋黄,采用冷冻真空干燥法制成干粉.

1.9 肉鸡饲养试验

将360只肉鸡饲养到20日龄后随机分为4个处理组,每组3个重复,每个重复30只,所有试验鸡均为母鸡. 试验周期30d,自由采食. 第1组为对照组,饲喂基础日粮;第2组为阴性蛋黄粉添加组,饲喂基础日粮+阴性蛋黄粉(300 g/t);第3组为低剂量 CCK 抗体添加组,饲喂基础日粮+含 CCK 抗体蛋黄粉(100 g/t);第4组为高剂量 CCK 抗体添加组,饲喂基础日粮+含 CCK 抗体蛋黄粉(300 g/t). 试验期间统计肉鸡全期采食量和体增质量,并计算饲料体增质量比.

1.10 数据统计

所有动物试验数据表示为平均数 $\pm$ 标准误,采用 SAS6.12 软件进行方差分析和多重比较.

2 结果

2.1 猪 CCK 基因活性片段的克隆与重组表达质粒的构建

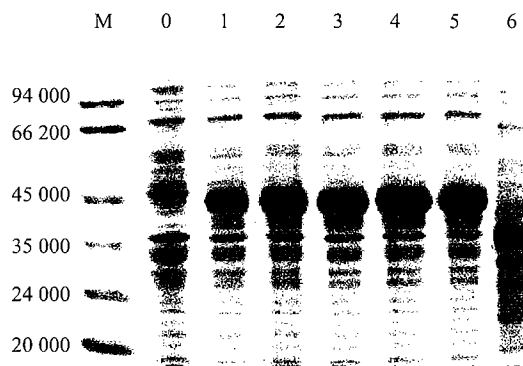
以猪脑组织总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 方法扩增了猪 CCK 基因 C-末端片段,大小为 210 bp. 将 CCK 基因片段克隆到谢青梅博士所设计的原核表达载体 pBCX 上,成功构建重组表达质粒 pBCX-CCK.

2.2 CCK 基因在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

将阳性重组质粒转化 *E. coli* BL21 进行诱导表达,用 SDS-PAGE 检测表达产物(如图1),与诱导前相比,在相对分子质量约 45 000 处出现明显的诱导蛋白条带,相对分子质量大小与预期一致. 凝胶扫描分析显示,最佳表达状态时融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 40.21%. 用 50% Ni-NTA 对表达产物进行纯化,可获得纯度较高的目的蛋白(如图2);用 Bradford 方法测得纯化后蛋白质量浓度为 8.86 mg/mL.

2.3 表达产物的可溶性分析及 Western-blotting 检测

蛋白可溶性分析显示,融合蛋白主要是以可溶形式表达的,如图3所示. 经 SDS-PAGE 电泳,然后转移到硝酸纤维素膜上,用兔抗 CCK-8 阳性血清对 CCK 融合蛋白进行 Western-blotting 分析,如图4所示. 在硝酸纤维素膜上出现一条带,大小与 SDS-PAGE 检测结果一致. 证实了融合蛋白 CCK 具有免疫活性.

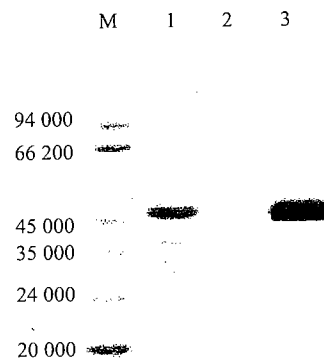


M: 蛋白质相对分子质量标准; 0~5: 分别为 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 和 5 h 的细菌裂解产物; 6: 空质粒对照

M: protein relative molecular mass marker; 0~5: bacterial lysate after 0, 1, 2, 3, 4 and 5 h induction with IPTG; 6: expression products of pBCX in BL21

图1 mysB-CCK 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the mysB-CCK fusion protein

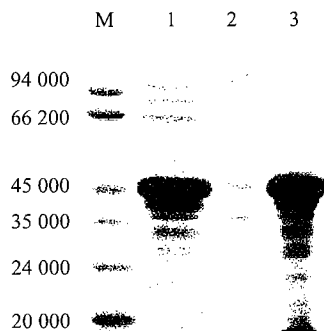


M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: lysis buffer 洗脱液; 2: wash buffer 洗脱液; 3: elution buffer 洗脱液

M: protein relative molecular mass marker; 1: eluent of lysis buffer; 2: eluent of wash buffer; 3: eluent of elution buffer

图2 mysB-CCK 纯融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified mysB-CCK fusion protein

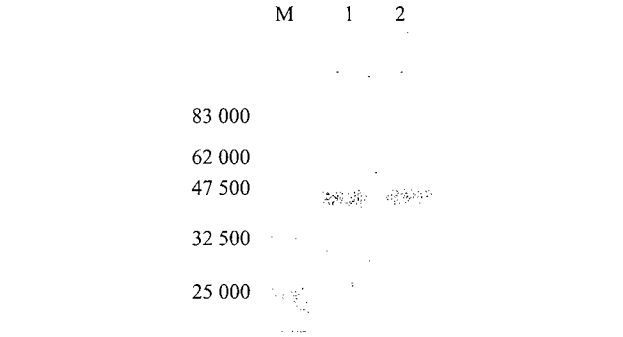


M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: pBCX-CCK 细菌裂解物上清液; 2: pBCX-CCK 细菌裂解物沉淀; 3: pBCX-CCK 细菌全菌液

M: protein relative molecular mass marker; 1: supernatant of CCK protein lysis; 2: sediment of CCK protein lysis; 3: expression products of pBCX-CCK in BL21

图3 mysB-CCK 表达产物的可溶性分析

Fig. 3 Solubility analysis of the expressed mysB-CCK protein



M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1~2: CCK 融合蛋白
M: prestained protein relative molecular mass marker; 1-2: CCK fusion protein

图4 mysB-CCK 表达产物的 Western-blotting 分析
Fig. 4 Western-blotting analysis of the expressed mysB-CCK protein

2.4 蛋鸡免疫试验

从表1、2可以看出,3次免疫后所采集的血清、蛋黄,空白对照组的ELISA检测结果均是 $P/N < 2$,而且变化幅度很小;试验组的抗体效价呈增加趋势,且均为 P/N 大于2,参照舒鼎铭等^[6]的方法($P/N > 2$ 为阳性),可判断本试验制备的抗血清及蛋黄为阳性,即免疫CCK可在鸡体内产生相应抗体($P < 0.05$)。

表1 蛋鸡免疫后血清中CCK抗体效价ELISA检测结果(P/N)¹⁾

Tab.1 Detection of chicken anti-CCK antibody in serum after immunization by ELISA (P/N)

组别 groups	试验时间 testing time/d			
	28	48	68	94
空白对照组 control group	1.009±0.018a	1.059±0.041a	0.993±0.035a	1.038±0.023a
免疫重组疫苗 immunized group	1.918±0.029Db	2.622±0.052Bb	3.087±0.060Ab	2.073±0.037Cb

1)经新复极差检验,同行大写字母不同表示差异显著($P < 0.05$);同列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

表2 蛋鸡免疫后蛋黄中CCK抗体效价ELISA检测结果(P/N)¹⁾

Tab.2 Detection of chicken anti-CCK antibody in yolk after immunization by ELISA (P/N)

组别 groups	试验时间 testing time/d			
	28	48	68	94
空白对照组 control group	0.950±0.015a	0.988±0.077a	0.961±0.065a	1.007±0.043a
免疫重组疫苗 immunized group	1.874±0.036Cc	2.751±0.018Bc	3.126±0.051Ab	1.472±0.046Db

1)经新复极差检验,同行大写字母不同表示差异显著($P < 0.05$);同列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

2.5 肉鸡饲养试验

从表3可见,低剂量、高剂量CCK抗体添加组,即饲喂饲料中分别添加100和300 g/t含CCK抗体蛋黄粉的肉鸡与阴性蛋黄粉组的相比,试验全期体增质量分别提高2.34%和3.80%;而采食量则分别提高0.91%和2.65%;但差异均不显著($P > 0.05$)。

表3 各试验组的体增质量、采食量和饲料体增质量比¹⁾
Tab.3 The body mass gain, feed intake and feed efficiency of every group

组别 groups	体增质量 body mass gain/g	采食量 feed intake/g	饲料体增质量比 feed gain ratio
空白对照组 control group	1 069.00±17.78	2 548.33±33.10	2.38±0.01
阴性蛋黄粉添加组 negative egg yolk group	1 069.67±19.74	2 561.11±6.55	2.40±0.04
低剂量CCK抗体添加组 low dose CCK antibody additive group	1 094.67±23.21	2 584.45±24.99	2.36±0.03
高剂量CCK抗体添加组 high dose CCK antibody additive group	1 110.33±2.03	2 628.89±16.95	2.37±0.02

1)经新复极差检验,同列各数据间差异不显著($P > 0.05$)

3 讨论

动物体内CCK分子是一类长短不一的分子的总称,各种形式的CCK分子是CCK原翻译后加工形成的;通过分析多种动物编码前CCK的原mRNA序列发现,不同种类动物的CCK基因序列同源性很低,而同一种类动物的不同品种的CCK基因序列高度保守^[9]。尽管不同种类动物的CCK基因序列差异性很大,但所有种属动物的CCK均含有相同的核苷酸片段,即C-末端硫化八肽,且被公认为是CCK外周和中枢生物学活性的基本单位。本研究从猪的脑组织中扩增出猪CCK基因活性片段,该片段包括了C-末端硫化八肽的序列,将此活性片段连接到高效可溶性原核表达载体pBCX中进行融合表达,Western-blotting试验证实了此融合表达的CCK蛋白能与CCK-8阳性血清发生特异性结合。虽然CCK分子在动物体内具有很多不同的分子形式,且不同种属动物的CCK基因表达产物也不尽相同,但CCK-8存在于所有种属动物体内,本研究表达的CCK融合蛋白能与兔抗CCK-8阳性血清发生特异性结合,说明其具有免疫活性。

本研究选用的pBCX表达系统是在pET43.1a(+)载体的基础上改造而成,加入了可增加蛋白可溶性的大肠杆菌mysB基因,因此,外源基因在该系统上表达主要是以可溶性的形式表达的。pBCX表

达系统与其他表达系统相比表达量较大,表达效率高,且带有6个组氨酸标记,便于融合蛋白的纯化.将制备的融合蛋白制成疫苗免疫产蛋鸡,采集蛋鸡血清进行ELISA测定,从试验结果可以看出该疫苗能刺激蛋鸡体内产生相应抗体,且可以传递到蛋黄中.在加强免疫和第3次免疫后,ELISA检测的 P/N 值有进一步的提高,说明本研究所表达的融合蛋白具有较好的免疫原性.

早在20世纪初,人们就认识到鸡的抗体具有从血液中转移到卵黄中的特性,IgY是禽蛋中天然存在的物质,没有残留和毒副作用,不会使细菌产生抗药性,其不仅有益于动物健康,而且可以改善生产性能^[10].本研究试图通过主动免疫蛋鸡获得抗CCK抗体,然后将CCK抗体做饲料添加剂饲喂畜禽后中和其内源CCK而达到提高采食量和生长性能的目的,通过试验可见免疫蛋鸡后获得的卵黄抗体经冷冻真空干燥后仍具有中和CCK的活性.但从肉鸡饲养试验结果可看出,通过添加含CCK抗体的蛋黄粉饲喂肉鸡可在一定程度上促进肉鸡增加采食量和提高其生长性能,但效果不明显,差异不显著.本文研制的含CCK抗体蛋黄粉在促肉鸡生长方面与前人的研究结果相比^[3-5],效果还不够理想.且蛋黄粉中CCK抗体如何进行定量、CCK抗体被畜禽采食后进入消化道消化吸收后还剩下多少功能完善的CCK抗体能发挥作用?这些问题还有待于进一步的探讨.

4 结论

本研究利用高效可溶表达载体制备了CCK融合蛋白,蛋鸡免疫试验表明制备的CCK融合蛋白具有良好的免疫源性.且粗制成了抗CCK卵黄抗体,肉鸡饲养试验表明该卵黄抗体可在一定程度上提高肉鸡的采食量和生长性能,但效果还不够理想,有待

于进一步研究提高.本研究为开发CCK卵黄抗体作为绿色饲料添加剂奠定了一定的基础.

参考文献:

- [1] BEINFELD M C. An introduction to neuronal cholecystokinin[J]. *Peptides*, 2001, 22:1197-1200.
- [2] DUNCAN E A, DAVITA G, WOODS S C. Changes in the satiating effect of cholecystokinin over repeated trials[J]. *Physiology & Behavior*, 2005, 85: 387-393.
- [3] PEKAS J C, TROUT W E. Stimulation of food intake and growth of swine by cholecystokinin immunization [J]. *Growth Dev Aging*, 1990, 54:51-56.
- [4] PEKAS J C. Immunogenicity of cholecystokinin octapeptide-conjugated antigens in pigs [J]. *Animal Science*, 1996, 74:1953-1958.
- [5] 丁雪梅. 胆囊收缩素主动免疫产蛋鸡的营养生理效应研究[D]. 成都:四川农业大学动物营养研究所, 2003.
- [6] 舒鼎铭, 覃健萍, 曹永长. 鸡缩胆囊素-33 串联体的构建、原核表达及免疫原性研究[J]. *华南农业大学学报*, 2006(2):96-99.
- [7] 舒鼎铭, 覃健萍, 曹永长, 等. 鸡缩胆囊素(CCK)在T4噬菌体表面的展示及免疫源性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 27(2):705-710.
- [8] 谢青梅. 蛋白抗体芯片研究[D]. 广州:华南农业大学动物科学学院, 2005.
- [9] JONSON L, SCHOEMAN N, SAAYMAN H, et al. Identification of ostrich and chicken cholecystokinin cDNA and intestinal peptides[J]. *Peptides*, 2000, 21:1337-1344.
- [10] SHIN J H, YANG M, NAM S W, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Clinical Diagnosis Lab Immunology*, 2002, 9(5): 1056-1066.

【责任编辑 柴 焰】