

具生物活性的重组鸡催乳素的制备

岳光芳¹, 陈益填², 刘颖¹, 李万利¹, 施振旦¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 广东省家禽科学研究所, 广东 广州 510440)

摘要:将鸡催乳素(PRL)成熟肽 cDNA 片段插入原核表达载体 pRSET A 的 *Nhe* I 和 *Hind* III 位点之间, 构建重组表达质粒 pPRL-SCAU. 将此质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 BL21(DE3), 将重组菌在含氨苄青霉素的 LB 培养基中培养, 再经 IPTG 诱导, 可以诱导表达相对分子质量约为 24 500 的重组鸡 PRL. 经 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后, 表达量达到最高, 占总菌体蛋白的 30% 左右. 表达的重组鸡 PRL 含组氨酸标记, 以包涵体形式存在, 可经 50% Ni-NTA 树脂分离纯化, 然后在透析复性后分离出可溶性部分. 将此可溶性重组鸡 PRL 对 3 月龄的鸽子在左侧嗉囊处相同位置隔 24 h 2 次皮内注射, 能够显著促进嗉囊上皮的增生. 与天然鸡催乳素的增生效果相比, 所表达的重组鸡 PRL 的生物学活性为天然催乳素的 17% 至 25%.

关键词:鸡 PRL 融合蛋白; 表达和纯化; 复性; 生物活性

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0069-05

Preparation of Bioactive Recombinant Chicken Prolactin

YUE Guang-fang¹, CHEN Yi-tian², LIU Ying¹, LI Wan-li¹, SHI Zhen-dan¹

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

2 Guangdong Institute of Poultry Science, Guangzhou 510440, China)

Abstract: The cDNA sequence of chicken prolactin (PRL) mature peptide was sub-cloned into *Nhe* I and *Hind* III sites of the expression vector pRSET A, to construct recombinant plasmid pPRL-SCAU. The recombinant plasmid was transfected into the *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). The transfected bacteria was grown in Loria broth medium supplemented with ampicillin. After induction with IPTG, the recombinant chicken PRL with a relative molecular mass of 24 500 was expressed in the form of inclusion body. The maximal expression rate, accounting for 30% of the total bacteria protein, was achieved after 4 h induction with 0.1 mmol/L IPTG. Following purification by 50% Ni-NTA agrose, the recombinant chicken prolactin was refolded by dialysis to soluble molecules. The bioactivity of such soluble PRL was tested in 3-month old pigeons. By intra-derma administration of soluble recombinant PRL into the skin exterior to the crop sac, in comparison with native chicken prolactin, and examination of growth of crop sac epithelium, the bioactivity of the prepared recombinant chicken prolactin was calculated to be approximately 17% to 25% of that of the native chicken prolactin.

Key words: recombinant chicken PRL; expression and purification; renaturation; biological activity

催乳素 (Prolactin, PRL), 是腺垂体催乳素细胞 (GH) 和胎盘催乳素 (Placental Lactogens, PLs) 属于同分泌的多肽激素. PRL 与生长激素 (Growth hormone, 一) 家族. 在不同的脊椎动物, PRL 表现为广泛的生物

收稿日期: 2008-04-25

作者简介: 岳光芳 (1982—), 女, 硕士; 通讯作者: 施振旦 (1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: zdshi@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30671504); 高校博士点专项基金 (20050564001)

学功能,包括电解质平衡、生长和发育、内分泌和代谢、行为、繁殖以及免疫调控和保护等约 300 多种功能^[1]. 在哺乳动物的研究中发现, PRL 对生殖活动具有双重调节作用. PRL 通过促进性腺促黄体素受体的表达,具有促进繁殖活动的作用^[2-5]. 而在季节性分泌高峰时,高浓度 PRL 又往往表现为抑制繁殖活动^[6-8]. 在禽(鸟)类, PRL 是促进母禽就巢孵卵行为和调控生殖活动的关键激素^[9];此外 PRL 也密切参与鸟类和许多哺乳动物繁殖季节活动的调节,如夏季光照延长时 PRL 分泌升高,抑制促性腺素分泌,抑制繁殖活动^[9-11]. 而另一些研究则发现, PRL 具有促进体外培养的禽类卵泡细胞促性腺激素受体的表达和促进孕酮分泌的作用^[12-13]. 这些都提示, PRL 对动物繁殖活动具有促进和抑制的双重调控作用,这两种不同的调控作用可能分别发生在下丘脑和性腺. 要分别研究 PRL 的两种调控机制,需要获得大量具有生物活性的 PRL 以用于离体和在体的研究工作. 本文因此制备了重组鸡 PRL,并利用鸽子嗉囊上皮细胞增生反应^[14],检测了该重组 PRL 的生物学活性.

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

含有 PRL 成熟肽 cDNA 的重组质粒鸡 pPRL-RSET^[15],表达大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 BL21 (DE3) 和 pRSET A 载体由华南农业大学动物遗传育种与繁殖实验室保存.

1.2 试剂和酶类

Pfu 聚合酶、*Taq* 聚合酶、dNTP s、UNIQ 210 质粒小量抽提试剂盒为上海生工产品. PCR 引物为上海英骏生物技术有限公司合成. 限制性内切酶 *Nhe* I, *Hind* III 为 Fermentas 产品, Ex *Taq* DNA 聚合酶、DL2000 相对分子质量标准、T4 连接酶、胶回收试剂盒、CIAP、相应缓冲液、IPTG 为 TaKaRa 产品,用于纯化的带有 His-tag 的 50% Ni-NTA 凝胶(Qiagen)为自基因公司(广州)产品.

1.3 PRL 原核表达载体的构建和成熟肽重组融合蛋白的表达

根据家鸡 PRL 成熟肽的序列,设计并由上海英骏生物技术有限公司合成一对引物:上游引物 G061021_0006 序列为:5'-ATAGCTAGCCTGCAATCTGCCCCATT-3'(编码区 130~147 位),含有 *Nhe* I 酶切位点. 下游引物 G061021_0007 序列为:

5'-CAGAAGCTTAGCAATTGCTATCATGGATTA-3'(编码区 707~727 位),含有 *Hind* III 酶切位点. 以含有 PRL 成熟肽的重组质粒 pPRL-RSET 为模板进行 PCR 扩增,将 PCR 扩增片段经 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后克隆入质粒 pRSET A 的相应酶切位点之间,构建重组表达质粒鸡 PR-PRL 并转化 *E. coli* BL21 (DE3). 进行 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定,以确定阅读框架的正确性. 挑取含重组子鸡 PR-PRL 的细菌单菌落于 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中,用 IPTG 诱导表达重组蛋白,SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达和分子大小,并用 Ni-NTA 凝胶在变性条件下按说明书纯化蛋白,最后用含有 8 mol/L 尿素的洗脱液洗脱下 PRL 重组融合蛋白.

1.4 重组质粒的转化和鉴定

所构建的重组质粒 pPRL-SCAU、转化 *E. coli* XL 12 Blue,筛选阳性菌落进行 PCR 和酶切鉴定,最后将鉴定正常的质粒交大连宝生物和上海博亚生物工程公司进行测序.

1.5 重组蛋白的表达和鉴定

将重组质粒转化 *E. coli* BL 21 (DE3),经 LB 培养基培养后,用 IPTG 诱导表达重组蛋白. SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达和分子大小,并检验通过 Ni-NTA 凝胶(Qiagen)纯化的带有 His-Tag 的重组蛋白的分子大小和蛋白纯化情况.

1.6 鸡 PRL 成熟肽重组融合蛋白的复性和浓缩

将用 8 mol/L 尿素溶液纯化得到的鸡 PRL 成熟肽依次经过含尿素分别为 6、4、4、2、2 和 0 mol/L,以及 pH 分别为 4.5、4.5、5.5、6.0、7.0 和 7.5 的 Tris-HCl(0.01 mol/L)/ NaH_2PO_4 (0.1 mol/L)缓冲液中透析. 透析后用聚乙二醇溶液适当吸收透析袋中的液体以浓缩蛋白,最后用蒸馏水充分清洗透析袋 4~5 次后吸取上清液,用紫外分光光度计(Eppendorf biophotometer 6131)测定蛋白浓度后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用.

1.7 动物试验处理

由广州市良田鸽业有限公司提供体质量大致相同的 3 月龄白羽王鸽后备种鸽(体质量 600 g 左右),平均分成 3 组,分别在位于左侧嗉囊表面皮肤皮内注射重组鸡 PRL 25 μg ($n=6$),50 μg ($n=5$)和天然鸡 PRL 5 μg ($n=6$). 试验前先在鸽子颈下胸骨处左侧嗉囊位置用油性笔标记注射位置,然后在该位置皮内第 1 次注射不同剂量的催乳素,第 2 次 24 h 之后在相同位置注射,注射后 20 h,检查注射的催乳素

已被完全吸收后宰杀并取腺囊,分开左右两侧分别在相同位置的相同面积刮去腺囊上皮.将每组每只鸽子注射的左侧腺囊上皮作为处理组,而未注射的右侧腺囊上皮作为对照组.将刮出的腺囊上皮放入已经称质量的离心管,之后将样品在 50 °C 烘 12 h 达恒质量,记录质量数据并分析.

1.8 数据处理

先用双因子方差分析法分析各处理鸽的腺囊上皮增生情况,然后在各处理剂量内左右两侧进行 *t*-检验,同时也将每剂量组的右侧(对照组)上皮增生质量进行方差分析和多重比较,再计算单位 PRL 对上皮增生的促进作用:(左侧腺囊上皮增生质量/右侧腺囊上皮增生质量)/注射催乳素质量,然后将重组催乳素的促进作用与天然催乳素的促进作用相比,得出重组催乳素的相对活性.

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建

2.1.1 PCR 以重组阳性质粒 pPRL-RSET 为模板,用引物 G061021_0006 和 G061021_0007 扩增出 1 条约 616 bp 的特异性片段.

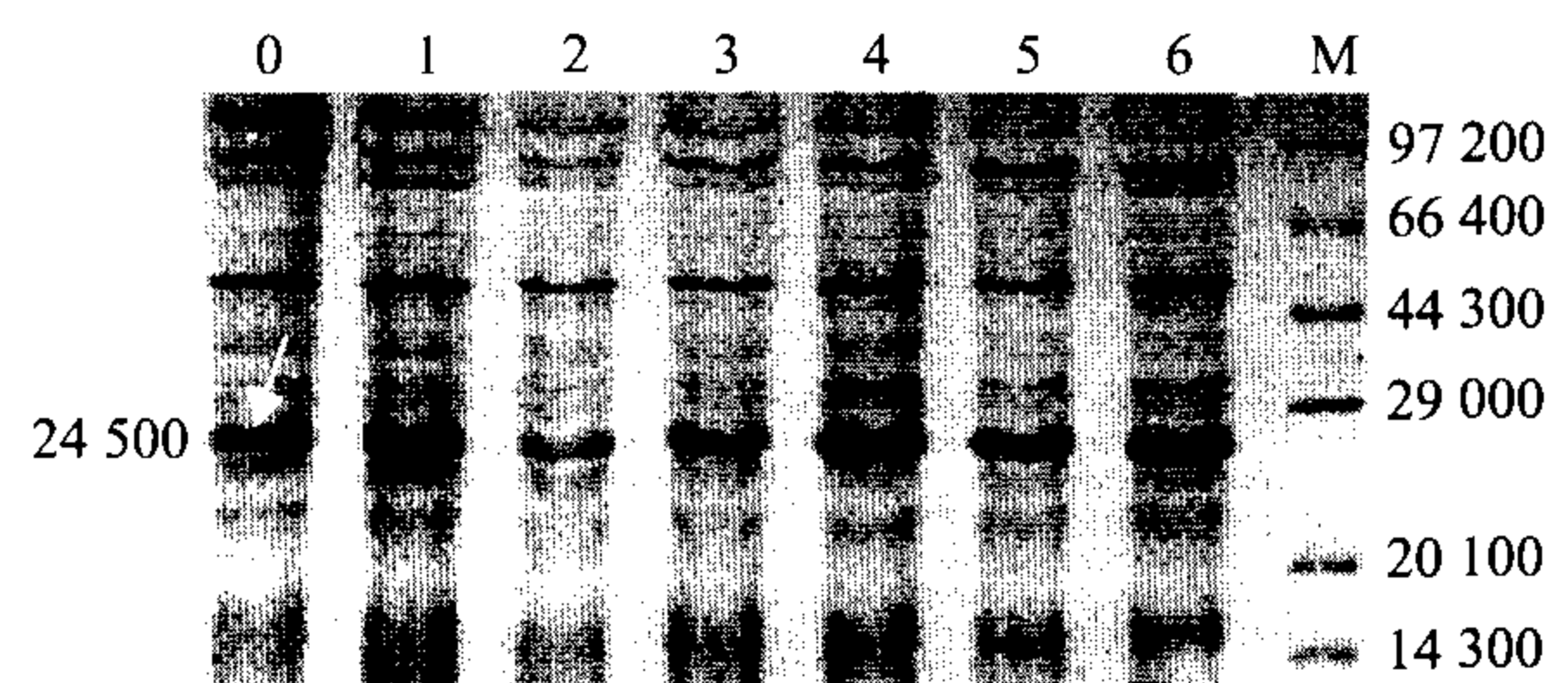
2.1.2 酶切鉴定 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切构建的重组质粒,都可相应得到正确的酶切片段 649 bp,说明已经成功构建了 pPRL-SCAU 质粒.

2.1.3 测序鉴定(数据未列出) 经上海英骏生物技术有限公司测序,重组质粒所克隆的序列均正确插入表达载体的相应克隆位点,各质粒都具有正确的阅读框架.表明 PR-PRL 编码序列和其模板序列完全相同.

2.2 PRL 成熟肽重组融合蛋白的表达和纯化

重组质粒 pPRL-SCAU 经 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序证明其序列维持了正确的阅读框架.其表达产物为 1 条 213 氨基酸残基的多肽,包含来自于载体 pRSET A 的 14 个氨基酸残基序列(含 6 × His 标签),之后的 PRL 成熟肽的 199 个氨基酸残基的片段,理论相对分子质量约为 24 500.含 pPRL-SCAU 重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 在 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 μg/mL)中 37 °C 振荡培养, $D_{600\text{nm}}$ 达到 0.6 以上后,加入 0.1 mmol/L IPTG 培养 4 h 时,PRL 成熟肽重组蛋白的表达量达到最高,占总菌体蛋白量 30% 左右;而且加入 IPTG 诱导的带有重组质粒的细菌的生长速度低于未诱导的细菌(图 1,图 2);所表达的目的蛋白主要以包涵体的形式存

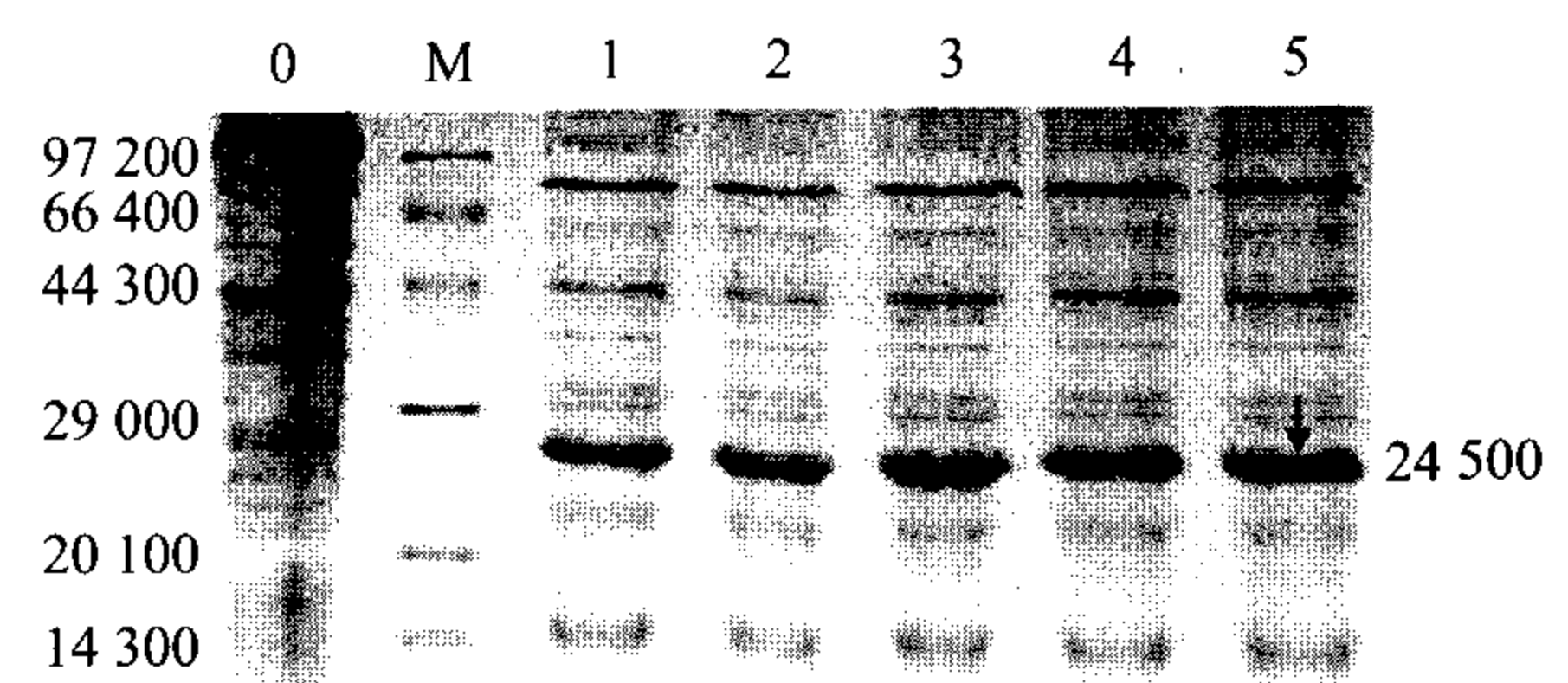
在.表达的蛋白在变性条件下可以用 50% Ni-NTA 树脂洗脱出 1 条纯化带,且相对分子质量与预期相符.



M:低相对分子质量蛋白质 Marker;0~6 分别为 0.1 mmol/L IPTG 诱导 0~6 h 后的表达产物,箭头所示为目的蛋白

图 1 重组质粒用 0.1 mmol/L IPTG 诱导不同时间表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed product of recombinant plasmid PR-PRL induced by 0.1 mmol/L IPTG for different times



M:低相对分子质量蛋白质 Marker;0~5 分别为 0、0.05、0.10、0.20、0.50、1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后的表达产物

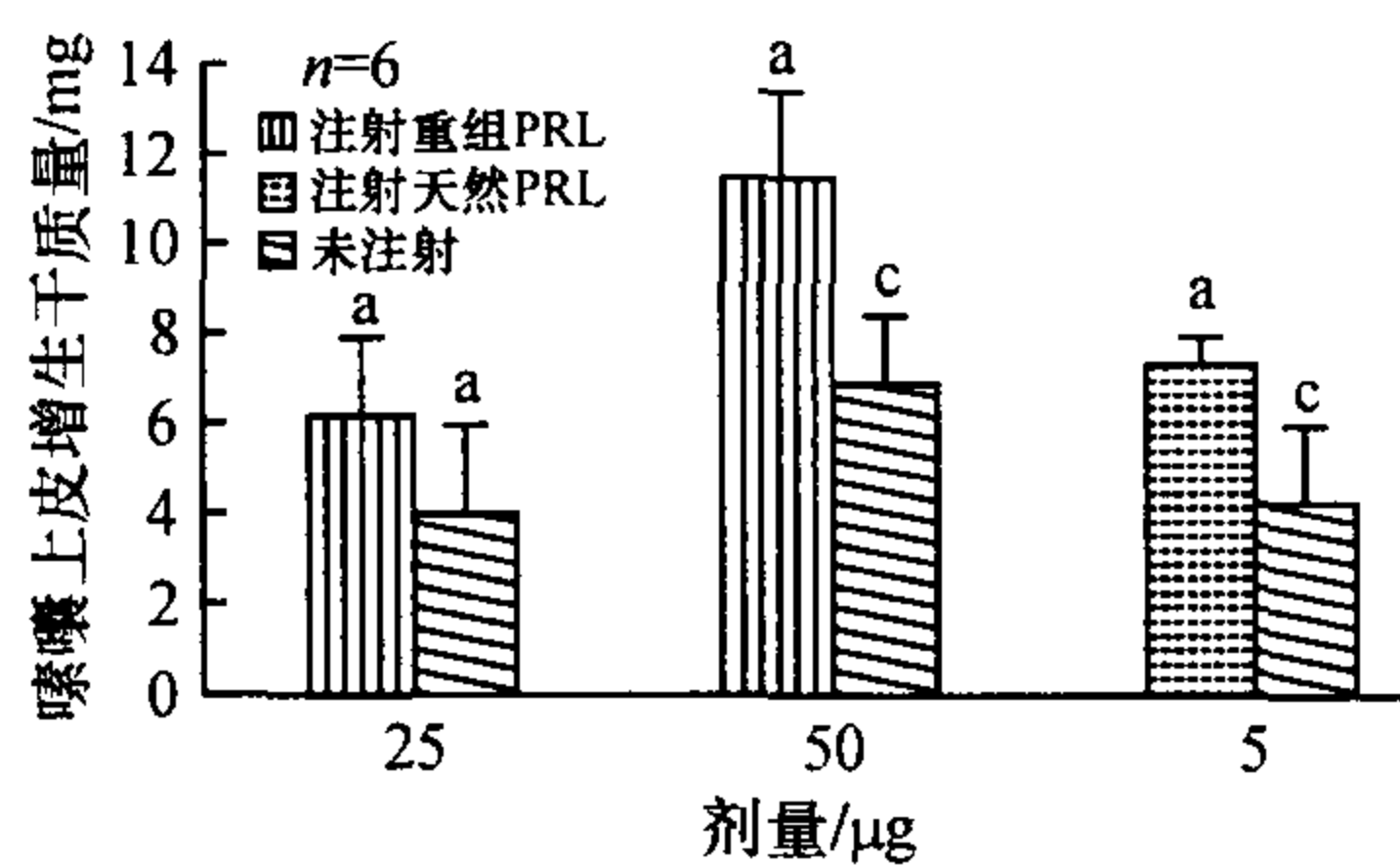
图 2 不同浓度的 IPTG 诱导 4 h 后蛋白表达情况

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed product of recombinant plasmid PR-PRL induced by different IPTG concentrations for 4 h

2.3 重组鸡 PRL 生物活性检测

对 3 月龄鸽子腺囊外表皮皮内注射重组鸡 PRL 后的腺囊上皮增生情况见图 3.注射 5 μg 天然 PRL 鸽子的左侧腺囊上皮质量极显著高于右侧(未注射)腺囊上皮质量(7.3 ± 0.3) mg 与(4.3 ± 0.7) mg, $P < 0.01$.注射 50 μg 重组 PRL 鸽子的左侧腺囊上皮质量也极显著高于右侧(未注射)腺囊上皮质量(11.5 ± 0.8) mg 与(6.9 ± 0.7) mg, $P < 0.01$.然而,注射 25 μg 重组 PRL 鸽子的左侧腺囊上皮质量仅稍稍高于右侧(未注射)腺囊上皮质量(6.2 ± 0.8) mg 与(4.2 ± 0.8) mg, $P > 0.05$.但是在注射 50 μg 重组 PRL 的鸽子组,作为对照的右侧腺囊上皮质量,显著高于注射 5 μg 天然 PRL 鸽子中作为对照组的右侧腺囊上皮质量(6.9 ± 0.7) mg 与(4.3 ± 0.7) mg, $P < 0.05$.

从对照喙囊上皮质量方面看,注射 25 μg 重组 PRL 鸽子的右侧喙囊上皮质量,与注射天然 PRL 鸽子的右侧喙囊上皮质量相同(4.2 ± 0.8) mg 与(4.3 ± 0.7) mg, $P > 0.05$. 因此,利用左侧与右侧喙囊上皮质量之商,再除以 PRL 注射质量,得出的单位 PRL 对上皮增生的促进作用,即换算出重组 PRL 的生物活性,注射 25 μg 重组 PRL 组为注射 5 μg 天然 PRL 组的 17%;而注射 50 μg 重组 PRL 组的左侧为注射 5 μg 天然 PRL 组的 16%,右侧为 9.6%. 因此粗略估算,重组 PRL 的活性应该达到天然 PRL 活性的 17% ~ 25%.



以注射中心为原点半径 2 cm 的圆形喙囊上皮增生干质量;同一组内相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)

图3 皮内注射 PRL 对鸽子喙囊上皮增生情况

Fig. 3 Pigeon crop sac mucosal epithelium growth response to recombinant PRL

3 讨论

本试验将鸡 PRL 的成熟肽 cDNA 插入表达质粒 pRSET A 的 *Nhe* I 和 *Hind* III 两位点之间,所表达的蛋白理论上由 213 个氨基酸残基组成,其中 N 端 14 个残基来自于质粒 pRSET A 的序列,其中包含 6 个组氨酸残基组成的用于纯化的 His-Tag 标签,以及之后的 199 个鸡 PRL 的氨基酸残基. 整个重组鸡 PRL 的理论相对分子质量为 24 500. 在实验操作中,经过引物设计、PCR 扩增、酶切、连接克隆以及测序,验证了所需要的目的片段已经被正确克隆入表达质粒. 而且所构建的重组表达质粒表达的重组 PRL 相对分子质量也为 24 500,与以上理论值相符. 同时,由于重组蛋白可由 Ni-NTA 凝胶结合并因此被纯化,说明蛋白分子中都具有来源于表达载体 pRSET A 的 6 个连续组氨酸序列(His-Tag). 这些结果都说明分子克隆操作和所表达的重组蛋白分子表达的正确性.

表达质粒 pRSET A 是 T7 启动子控制下的融合表达载体,具有高效表达的能力. 因此,以此为基础构建的 pPRL-SCAU 重组表达质粒在 *E. coli* BL21

(DE3) 中用 IPTG (0.1 mmol/L) 诱导表达 4 h 达到最高表达量,占总菌体蛋白量 30% 左右. 高效原表达常常使目的蛋白形成不溶于水的包涵体,这是蛋白在胞内互相凝集而形成的无活性颗粒,造成蛋白不能正确折叠,使其失去生物活性. 因此为了获得具有生物活性的重组 PRL,我们在变性状态下分离纯化后的重组 PRL,经过一系列非恒速下降的尿素浓度和非恒速上升的 pH 值进行透析,对变性蛋白(已稀释)进行缓慢而连续的透析复性,使 PRL 分子在尿素浓度降低时能够尽量减少中间聚集体的产生,使其能够正确折叠成为可溶性蛋白. 一般一次透析后,约 70% ~ 80% 的重组 PRL 成为可溶性蛋白.

通过鸽喙囊上皮增生的生物学测定法测定重组 PRL 的生物活性,并与天然 PRL 进行了比较. 首先在 2 种注射剂量中,都发现促进了喙囊上皮的增生,这一促进程度在高剂量组更为显著;而且通过与天然 PRL 处理鸽子的右侧对照组相比较,高剂量组的未注射的右侧喙囊上皮也发生了增生. 这可能是由于注射剂量过大(50 μg),造成一部分 PRL 进入血液循环而又促进了高剂量组右侧(未注射)喙囊上皮的增生. 按低剂量处理鸽子的喙囊上皮增生计算,重组 PRL 的生物活性约为天然 PRL 的 17%;而按高剂量组的左、右两侧喙囊上皮增生计算,重组 PRL 的生物活性应该高于天然 PRL 的 25%. 这一差异,可能说明激素的生物效果与剂量之间并不呈等比例关系,而呈现指数比例关系^[14].

本实验所制备的重组鸡 PRL 生物学活性比天然 PRL 的活性低,主要原因可能有以下几方面:第一是蛋白在透析复性过程中,虽然重组 PRL 能够溶于水,但可能分子仍具有一定的原来包涵体的错乱构象,未能够完全恢复天然 PRL 分子的正确空间构象,致使活性降低;第二,本次构建的重组 PRL,在其 N 端具有一个来源于表达质粒的 14 个氨基酸标签的存在,也可能会一定程度影响重组催乳素的空间构象及其生物活性;第三可能是原核细胞缺乏真核细胞所特有的翻译后加工修饰系统,如糖基化,而使糖蛋白生物活性减小. 有研究表明 PRL 各种生物学活性由它的构象调节,PRL 存在有糖基化、磷酸化、脱氨基、硫酸化和高相对分子质量的蛋白多聚体等多种形式^[11]. 鸡的 PRL 在第 56 个氨基酸残基有一个可选择的糖基化位点(Asn-Gly-Cys),而且鸡垂体分泌的天然 PRL 中,除了出现一个约 23 000 的 PRL 外,还存在有更多的约 26 500 的糖基化形式的催乳

素^[16]. 因此本实验由原核表达系统生成的重组 PRL 因为缺乏糖基化(相对分子质量等于理论相对分子质量),其活性要比天然 PRL 低. 本实验所获得的重组鸡 PRL,将能够用于今后的其他研究工作,如调控禽类卵泡发育、以及 PRLR 的信号传导等.

参考文献:

- [1] FREEMAN M E, LA KANYICKSKA B, LERANT A, et al. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80: 1523-1631.
- [2] BARTKE A, CROFT B, DALTERIO S. Prolactin restores plasma testosterone levels and stimulates testicular growth in hamsters exposed to short day-length [J]. *Endocrinology*, 1975, 97: 1601-1604.
- [3] WELSH T H, Jr., KASSON B G, HSUEH A J. Direct biphasic modulation of gonadotropin-stimulated testicular androgen biosynthesis by prolactin [J]. *Biol Reprod*, 1986, 34(5): 796-804.
- [4] 夏国良, 庄临之, 杨传任. 催乳素调节绵羊睾丸间质细胞睾酮分泌机制的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 1995, 26(5): 385-390.
- [5] HOWELL-SKALLA L A, BUNICK D, NELSON R A, et al. Testicular recrudescence in the male black bear (*Ursus americanus*): changes in testicular luteinizing hormone-, follicle-stimulating hormone-, and prolactin-receptor ribonucleic acid abundance and dependency on Prolactin [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63: 440-447.
- [6] BUBENIK G A, SCHAMS D, LEATHERLAND J F. Seasonal rhythms of prolactin and its role in the antler cycles of white-tailed deer [C] // FENNESSY P F, DREW K R. *Biology of deer production*. Wellington: The Royal Society of New Zealand, Bulltin 22, 1985: 185-190.
- [7] CURLEWIS J D, LOUDON A S I, MILNE J A, et al. Effect of chronic long-acting bromocriptine treatment on live weight, voluntary food intake, coat growth and breeding season in non-pregnant red deer hinds [J]. *Journal of Endocrinology*, 1988, 119: 413-420.
- [8] CURLEWIS J D. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1992, 4(1): 1-23.
- [9] CHAISEHA Y, EL HALAWANI M E. Neuroendocrinology of the female turkey reproductive cycle [J]. *J Poult Sci*, 2005, 42: 87-100.
- [10] SHARP P J, BLACHE D. A neuroendocrine model for prolactin as the key mediator of seasonal breeding in birds under long- and short-day photoperiods [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81: 350-358.
- [11] SHIMADA K, OHKUBO T, SAITO N, et al. The molecular biology of prolactin [C] // SHARP P J. *Avian endocrinology*. Bristol: Journal of Endocrinology Ltd, 1993: 135-148.
- [12] 李莹辉, 汪琳仙, 杨传任. 催乳素及生长因子对体外培养的鸡卵泡膜细胞增值的调节作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 1999, 15(1): 86-87.
- [13] PORTER M B, BRUMSTED J R, SITES C K. Effect of prolactin on follicle-stimulating hormone receptor binding and progesterone production in cultured porcine granulosa cells [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(1): 99-105.
- [14] NICOLL C. Bioassay of prolactin: Analysis of the pigeon crop sac response to local prolactin injection by an objective and quantitative method [J]. *Endocrinology*, 1967, 80, 641-655.
- [15] 刘颖, 施振旦, 黄运茂, 等. 家鸡催乳素和抑制素 α 亚基重组融合蛋白的构建 [J]. *中国兽医学报*, 2002, 22: 365-367.
- [16] LIU Z, SHI Z D, LIU Y, et al. Molecular cloning and characterisation of the Magang goose prolactin [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155, 208-216.

【责任编辑 柴 焰】