

雷明明, 吴思谦, 李孝伟, 等. 鸡瘦素受体胞外域成熟肽重组蛋白质的表达以及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1105-1109.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.025

鸡瘦素受体胞外域成熟肽重组蛋白质的表达以及多克隆抗体的制备

雷明明¹, 吴思谦², 李孝伟², 施振旦¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 根据鸡瘦素受体基因(*LEPR*)编码区序列(GenBank:NM_AB033383)设计并合成2对引物,以鸡肝脏cDNA为模板扩增鸡*LEPR*胞外域2段cDNA序列。然后将这2段序列克隆到表达载体pRSET-A的*Bam*H I和*Hind* III酶切位点之间,构建重组表达载体(pR-*LEPR1*和pR-*LEPR2*)并转化大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)。转化菌在IPTG诱导后分别表达了分子量为 2.62×10^4 的LEPR1和分子量为 2.86×10^4 的LEPR2重组蛋白质。经凝胶Ni-NTA纯化后的重组蛋白质与矿物油佐剂混合免疫生长鸡,经过3次免疫之后,获得高效价的抗LEPR1和抗LEPR2抗血清。

关键词: 瘦素受体; 成熟肽序列; 克隆和表达; 多克隆抗体

中图分类号: S831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1105-05

Expression of recombinant protein of chicken leptin receptor extracellular domain mature peptide and the preparation of its polyclonal antibody

LEI Ming-ming¹, WU Si-qian², LI Xiao-wei², SHI Zhen-dan¹

(1. Laboratory of Animal Breed Improvement and Reproduction, Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two pairs of primers designed based on the chicken leptin receptor gene (*LEPR*) mature peptide sequence (GenBank:NM_AB033383) were used to amplify two cDNA sequence fragments of chicken *LEPR* extracellular domains (ECD) mature peptides with chicken liver cDNA as the template. The two cDNA sequence fragments were cloned into the *Bam*H I and *Hind* III sites of the plasmid pRSET-A to generate the expression vector pR-*LEPR1* and pR-*LEPR2*, which were further transformed into bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). The transformed bacteria were induced to produce recombinant proteins LEPR1 and LEPR2 with the expected molecular mass of 2.62×10^4

and 2.86×10^4 by IPTG. The recombinant LEPR1 and LEPR2 were purified and mixed into mineral oil adjuvant to immunize growing chickens to produce anti-LEPR1 and anti-LEPR2 antibodies. Antisera with high anti-LEPR1 and anti-LEPR2 titers were obtained after three immunizations.

Key words: leptin receptor; mature peptide; cloning and expression; polyclonal antibody

收稿日期: 2015-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501946); 江苏省自然科学基金项目(BK20150544)

作者简介: 雷明明(1977-), 女, 湖北赤壁人, 博士, 研究方向为动物遗传与繁殖内分泌。(Tel) 025-84390772; (E-mail) mm0529@163.com

通讯作者: 施振旦(1964-), (Tel) 025-84390956; (E-mail) zdshi@mail.jaas.ac.cn

瘦素 (Leptin) 是由白色脂肪细胞分泌的一种多肽, 在调节摄食、代谢和能量平衡方面有重要作用^[1-2]。在中枢神经系统, 瘦素可以抑制下丘脑神经肽 Y 和促进肥胖素 (Orexin) 的表达来抑制摄食^[3]。在外周能量代谢调控中, 瘦素可以通过降低血糖浓度和提高 AMP 激活蛋白激酶 (AMPK) 的活性来促进代谢^[4], 刺激脂肪氧化代谢和降低胰岛素样生长因子-I (IGF-I) 的分泌来降低甘油三酯的浓度^[5-6]。1998 年 Taouis 等首次报道了鸡瘦素基因^[7], 随后 Friedman-Einat 等报道无法检测鸡等鸟类血清中的瘦素^[8], Hen 等利用瘦素信号传导细胞模型也几乎检测不到鸡血液瘦素信号^[9], Pitel 等报道鸡基因组缺失哺乳动物瘦素基因座位区域^[10]。最近一些研究者相继报道发现了草雀、鸽子、鸭子等瘦素基因片段和基因^[11-12]。2014 年, 日本学者 Ohkubo 等也报道鸡血清中可能存在瘦素^[13]。尽管对鸡是否存在瘦素仍有争议, 但鸡瘦素受体 (Leptin receptor, LEPR) 是真实存在的, 并且在鸡的许多组织中表达^[14-15]。

LEPR 有 a、b、c、d、e、f 6 种不同的亚型^[16], 其中 a、c、d、e、f 这 5 种是短型受体, b 是长型受体。这些亚型中只有长型受体 LEPR-b 包含了激活 JAK-STAT 信号传导途径所必需的一段胞质区和疏水氨基酸残基, 是瘦素的重要功能性受体。鸡 LEPR-b 有 1 148 个氨基酸, 在胞质区有 3 个保守的酪氨酸残基, 分别是 Tyr985、Tyr1077 和 Tyr1138, 这 3 个氨基酸在 LEPR 激活的过程中起重要作用。2014 年 Lei 等研究发现对生长鸡免疫 LEPR 胞外域后产生的抗 LEPR 抗体可以显著加强 LEPR 的信号转导, 促进脂肪代谢相关基因的表达和降低脂肪合成基因的表达, 导致脂肪沉积减少^[17]。但是, 对鸡免疫 LEPR 胞外域后产生的抗 LEPR 抗体加强 LEPR 信号转导的作用机理尚不清楚, 需要进一步深入研究。因此, 本研究旨在通过构建鸡受体胞外域蛋白融合表达载体, 获得鸡瘦素受体胞外域不同区域融合蛋白, 并且利用融合蛋白制备受体特异性的多克隆抗体, 为研究鸡瘦素和鸡瘦素受体的生物功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pMD₁₈-T 载体购自 TaKaRa 公司, *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3) 和 pRSET-A 由江苏省农业科学院畜牧研究所动物品种改良与繁育重点实验室保

存。限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、*Ex Taq* DNA 聚合酶、DL2000 分子量标准、T4 连接酶及胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品。用于纯化的带 His-tag 的 50% Ni-NTA 凝胶 (Qiagen) 购自基因公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 鸡 LEPR 成熟肽基因序列的克隆、重组蛋白质表达和纯化

根据鸡 LEPR 基因编码区的核苷酸序列 (GenBank: NM_204323.1) 设计 2 对引物并由上海英骏公司合成。第 1 对引物在 N-末端, 成熟肽包含第 101 ~ 300 位的共 200 个氨基酸残基, 上游引物序列为 5'-ATCGGATCCAGGATGCTTATTCCTTCAGA-3', 下游引物序列为 5'-CTGAAGCTTAGCACCTCACTTGAGCAAAG-3'; 第 2 对引物在胞外域的近膜段, 成熟肽包含第 582 ~ 796 位上的共 215 个氨基酸残基, 上游引物序列为 5'-ATCGGATCCAGCGTACCAACAAGATCAGC-3', 下游引物序列为 5'-GCTAAGCTTACTCAATCAGAATAAAGTGCTCAT-3'。引物中包含有 *Hind* III 酶切位点和 *Bam*H I 酶切位点。将鸡的肝脏组织 cDNA 作为模板, 用这 2 对引物进行 PCR 扩增, 分别得到 1 条 600 bp 和 1 条 645 bp 的 2 段 LEPR, 然后分别将这 2 段 LEPR 克隆插入 pMD₁₈-T 载体构建重组质粒 pLEPR1 和 pLEPR2, 并将其转化入 *E. coli* DH5 α 细胞株增殖复制。

抽提 pLEPR1 和 pLEPR2 质粒并用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 经凝胶电泳分离回收 LEPR1 和 LEPR2 cDNA 片段, 并克隆插入表达载体 pRSET-A 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 两位点之间, 构建 pR-LEPR1 和 pR-LEPR2 重组载体。将这 2 个载体转化到 *E. coli* BL21 (DE3), 用 IPTG 诱导表达 pR-LEPR1 和 pR-LEPR2 重组蛋白质, 经 SDS-PAGE 验证蛋白的表达和分子大小之后, 用 50% Ni-NTA 凝胶在变性条件下进行纯化。

1.3 LEPR1 和 LEPR2 特异性多抗的制备和纯化

将纯化并透析复性后的 LEPR1 和 LEPR2 重组蛋白质与白油混合制成含重组蛋白质 1 mg/ml 的油乳剂, 并对生长鸡进行肌肉注射, 每只注射油乳剂 1 ml。间隔 14 d 免疫 1 次, 共免疫 3 次。每次免疫前翅下静脉采血, 第 3 次免疫后第 5 d 翅下静脉采血。用 33% 饱和硫酸铵纯化多克隆抗体, 纯化得到的抗体保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

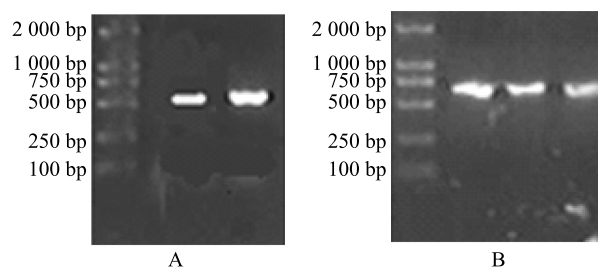
1.4 ELISA 检测抗血清效价

将 LEPR1 和 LEPR2 抗原稀释至浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 包被 96 微孔酶标板,每孔加入 100 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,次日倒掉包被液,用洗涤液(0.05% Tween+PBS)洗 3 次,加 5% 的 BSA-PBS 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,洗涤 3 次后依次加免疫血清、HRP 羊抗鸡 IgG (1:4 000 稀释),最后加底物 TMB,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 25 min,加 2 mol/L 硫酸终止反应,测定 450 nm 光吸收值作为抗体效价。

2 结果与分析

2.1 鸡 LEPR1 和 LEPR2 基因 cDNA 克隆

从鸡肝脏组织中提取总 RNA,经反转录和 PCR 扩增后,获得 2 条特异条带,长度与预期的相符。经测序证明获得的序列为鸡 LEPR 基因 cDNA 序列,与 GenBank 中所提交的序列完全一致,包含所引入的 2 个酶切位点。通过双酶切和连接将鸡 LEPR 基因 2 个 cDNA 片段插入原核表达载体 pRSET-A,获得重组的表达载体 pR-LEPR1 和 pR-LEPR2。经过 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定,分别获得长度长为 600 bp 和 645 bp 的片段(图 1)。



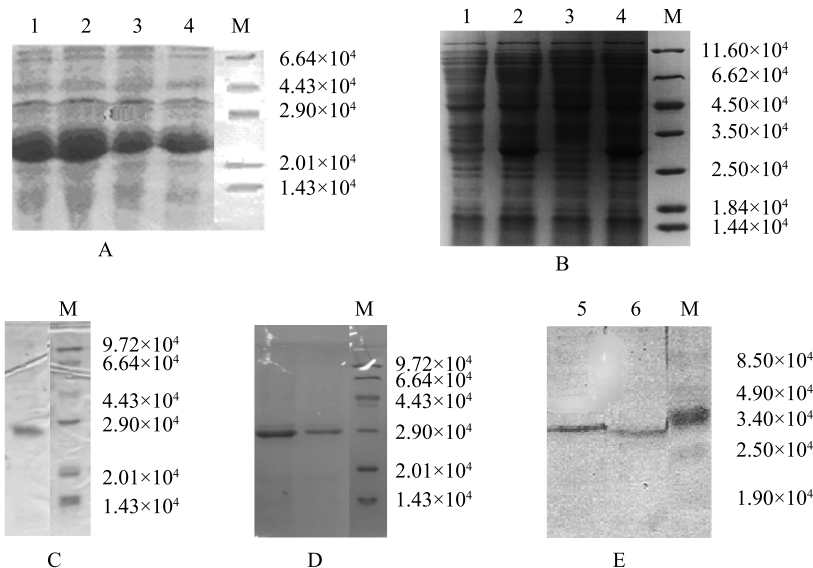
M:LD2 000 bp ladder;A:LEPR1 基因的 RT-PCR 克隆;B:LEPR2 基因的 RT-PCR 克隆。

图 1 鸡 LEPR1 和 LEPR2 基因的 RT-PCR 克隆

Fig.1 The amplification of chicken LEPR1 and LEPR2 genes by RT-PCR

2.2 在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达的鸡 LEPR1 和 LEPR2 成熟肽及其纯化

转化重组质粒 pR-LEPR1 和 pR-LEPR2 的 *E. coli* BL21(DE3) 株在 LB(AMP⁺) 液体培养基中培养并经 IPTG 诱导后,表达出分子量约为 2.62×10^4 的 LEPR1 和分子量约为 2.86×10^4 的 LEPR2 重组蛋白质(图 2)。对 2 个重组蛋白质进行 Western blot 分析,发现转化重组质粒有免疫条带出现(图 2),说明 pR-LEPR1 和 pR-LEPR2 正确表达出含有鸡 LEPR 的 2 段融合蛋白质。



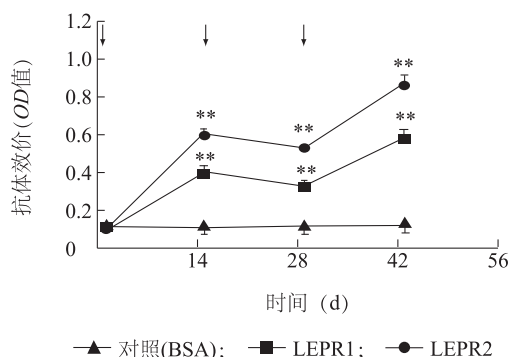
A:原核表达的鸡 LEPR1 重组蛋白质;B:原核表达的鸡 LEPR2 重组蛋白质;C:纯化后的 LEPR1 蛋白质;D:纯化后的 LEPR2 蛋白质;E:蛋白质 Western blot 检测。M:蛋白质分子量标准;1,3:没有用 IPTG 诱导的 pR-LEPR2 原核表达包涵体;2,4:用 IPTG 诱导的 pR-LEPR1 原核表达包涵体;5:重组蛋白质 LEPR2;6:重组蛋白质 LEPR1。

图 2 原核表达的鸡 LEPR1 和 LEPR2 重组蛋白质的表达以及纯化蛋白质的电泳图谱和 Western blot 检测图

Fig.2 The expression of recombinant chicken LEPR1 and LEPR2 proteins, SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein, and Western blot analysis of the recombinant protein

2.3 ELISA 检测血清抗体效价

从图 3 可以看出,在免疫 LPER1 和 LEPR2 重组蛋白质之后鸡血清中多克隆抗体 LPER1 抗体和 LEPR2 抗体的抗体效价(由 ELISA 分析的 OD 值代表)逐渐升高。免疫前血清中抗体效价较低,免疫 2 次后效价有所上升,免疫 3 次后效价进一步升高。



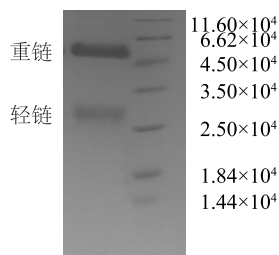
箭头表示免疫时间; ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 3 免疫 LEPR1、LEPR2 和 BSA 后鸡血清中多克隆 LEPR1 抗体和 LEPR2 抗体的抗体效价

Fig. 3 Anti-LEPR1 and anti-LEPR2 antibody titers in chicken antiserum after immunization

2.4 抗 LEPR1 和 LEPR2 多克隆抗体的纯化

反复用 33% 饱和硫酸铵提纯鸡血清,收集蛋白质并进行 SDS-PAGE 电泳。电泳图谱出现较纯的轻链(分子量 2.5×10^4)和重链(5.5×10^4)条带(图 4),抗体纯度达到 96% 以上。用 ELISA 测定纯化后抗体的效价,纯化后 1.2 mg/ml 多克隆抗体按倍比稀释,随着抗体浓度越来越低,显色越来越浅,稀释至 1:6 400 时 P/N 值仍大于 2。



M: 蛋白质分子量标准。

图 4 纯化后多克隆抗体的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 SDS-PAGE profile of purified polyclonal antibody

3 讨论

本研究克隆了鸡 LEPR 基因胞外域 2 段 cDNA 序列,将鸡 LEPR 基因胞外域 2 段 cDNA 序列插入表达质粒 pRSET-A 的 BamH I 和 Hind III 两酶切位点之间,表达出 2 个融合蛋白质。一个融合蛋白质由 236 个氨基酸残基组成,其 N 端 36 个残基(包括 6×His 的组氨酸标签)源自 pRSET-A 的序列,C 端的 200 个氨基酸残基源自鸡 LEPR;另一个融合蛋白质有 251 个氨基酸残基,同样 N 端 36 个氨基酸残基(包括 6×His 的组氨酸标签)源自 pRSET-A 的序列,C 端的 215 个氨基酸残基源自鸡 LEPR。经过多重 PCR 扩增、酶切和连接等,获得阅读框架正确的表达载体 pR-LEPR1 和 pR-LEPR2。所表达的重组蛋白质可与 Ni-NTA 凝胶结合并被纯化,说明蛋白质分子中具有来源于表达载体 pRSET-A 的 6 个连续组氨酸标签序列(His-Tag)。说明分子克隆操作和所表达的重组蛋白质分子表达的正确性,为动物免疫实验等研究工作奠定了基础。

本研究获得的多克隆抗体来自于经 LEPR 抗原免疫的鸡血清,这种蛋白质抗原具有多个不同的抗原决定簇,为了获得特异性高的多克隆抗体需要纯度较高的抗原。抗 LEPR1 和抗 LEPR2 两种多克隆抗体的效价测定结果显示,随着免疫次数的增加,多克隆抗体效价不断升高。抗体是一种特殊分子,它不仅可以和受体结合,而且可以触发受体的信号转导,最典型的例子就是 Graves 病症,病人自身产生抗 TSHR 抗体导致甲状腺功能亢进^[18-19]。以受体的胞外区蛋白质作为抗原,通过主动免疫可以不断提高抗体效价,刺激或拮抗受体信号^[20]。对产蛋鸡免疫重组蛋白质 LEPR1 后发现抗 LEPR1 抗体可以显著加强 LEPR 的信号转导,抑制卵泡发育和降低产蛋率^[21];同样对生长鸡免疫融合蛋白质 LPER2 后发现抗 LEPR2 抗体也可以显著加强 LEPR 的信号转导,促进脂肪代谢和抑制脂肪沉积^[17]。这些研究结果表明对鸡免疫 LPER 蛋白质产生的抗 LPER 抗体加强了 Leptin 样物质的生物活性。抗体与受体如何作用加强 LEPR 信号转导的机理并不清楚,需要进一步研究。而本研究所制备的高纯度抗 LEPR1 和抗 LEPR2 两种多克隆抗体,则可以应用于研究抗体与受体间的动力学和调控脂肪代谢和繁殖性状的研究工作。

参考文献:

- [1] PELLEYMOUNTER M A, CULLEN M J, BAKER M B, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice [J]. *Science*, 1995, 269: 540-543.
- [2] STOCKEBRAND M, SAUTER K, NEU A, et al. Differential regulation of AMPK activation in leptin- and creatine-deficient mice [J]. *The FASEB Journal*, 2013, 27:4147-4156.
- [3] KANOSKI S E, ALHADEFF A L, FORTIN S M, et al. Leptin signaling in the medial nucleus tractus solitarius reduces foodseeking and willingness to work for food [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39: 605-613.
- [4] BRABANT G, MULLER G, HORN R, et al. Hepatic leptin signaling in obesity [J]. *The FASEB Journal*, 2005, 19: 1048-1050.
- [5] ATKINSON L L, FISCHER M A, LOPASCHUK G D. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 29424-29430.
- [6] LEE Y, NASEEM R H, DUPLOMB L, et al. Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice [J]. *PNAS*, 2004, 101: 13624-13629.
- [7] TAOUIS M, CHEN J W, DAVIAUD C, et al. Cloning the chicken leptin gene [J]. *Gene*, 1998, 208: 239-242.
- [8] FRIEDMAN-EINAT M, BOSWELL T, HOREV G, et al. The chicken leptin gene; Has it been cloned? [J] *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 115: 354-363.
- [9] HEN G, YOSEFI S, RONIN A, et al. Monitoring leptin activity using the chicken leptin receptor [J]. *J Endocrinol*, 2008, 197: 325-333.
- [10] PITEF F, FARAUT T, BRUNEAU G, et al. Is there a leptin gene in the chicken genome? Lessons from phylogenetics, bioinformatics and genomics [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 167:1-5.
- [11] HUANG G, LI J, WANG H, et al. Discovery of a novel functional leptin protein (LEP) in zebra finches; evidence for the existence of an authentic avian leptin gene predominantly expressed in the brain and pituitary [J]. *Endocrinology*, 2014, 155 (9): 3385-3396.
- [12] PROKOP J W, SCHMIDT C, GASPER D, et al. Discovery of the elusive leptin in birds: identification of several 'missing links' in the evolution of leptin and its receptor [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3): e92751.
- [13] OHKUBO T, HIROTA K, MURASE D E, et al. Avian blood induced intranuclear translocation of STAT3 via the chicken leptin receptor [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2014, 174:9-14.
- [14] HOREV G, EINAT P, AHARONI T, et al. Molecular cloning and properties of the chicken leptin-receptor (CLEPR) gene [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 162: 95-106.
- [15] OHKUBO T, TANAKA M, NAKASHIMA K. Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor (cOb-R) mRNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1491: 303-308.
- [16] TARTAGLIA L A. The leptin receptor [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 6093-6096.
- [17] LEI M M, WU S Q, SHAO X B, et al. Creating leptin-like biofunctions by active immunization against cLEPR in growing chickens [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2015, 50: 55-64.
- [18] RAPOPORT B, CHAZENBALK G D, JAUME J C, et al. The thyrotropin (TSH)-releasing hormone receptor: interaction with TSH and autoantibodies [J]. *Endocr Rev*, 1998, 19: 673-716.
- [19] MCLACHLAN S M, NAGAYAMA Y, RAPOPORT B. Insight into graves' hyperthyroidism from animal models [J]. *Endocr Rev*, 2005, 26: 800-832.
- [20] HILL R A, FLINT D J, PELL J M. Antibodies as molecular mimics of biomolecules: roles in understanding physiological functions and mechanisms [J]. *Adv Physiol Educ*, 2008, 32:261-273.
- [21] LEI M, WU S, LI X, et al. Leptin receptor signaling inhibits ovarian follicle development and egg laying in chicken hens [J]. *Repro Biol and Endocri*, 2014, 8:25.

(责任编辑:张震林)