

雷明明, 邵西兵, 施振旦. 鸽子瘦素基因成熟肽重组蛋白的表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 1 ): 155-158.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.025

## 鸽子瘦素基因成熟肽重组蛋白的表达及多克隆抗体的制备

雷明明<sup>1</sup>, 邵西兵<sup>2</sup>, 施振旦<sup>1</sup>

(1. 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, 江苏 南京 210014; 2. 广东省家禽研究所, 广东 广州 510643)

**摘要:** 根据鸽子瘦素基因(*leptin*)编码区序列(GenBank: HG797022)设计并合成鸽子 *leptin* 基因编码胞外域成熟肽的 cDNA 序列, 然后将这段序列克隆到表达载体 pGEX-4T-1 的 *Eco* R I 与 *Not* I 酶切位点之间, 构建重组表达载体(pGEX-4T-1-*leptin*)并将该载体转化到大肠杆菌 Arctic Express 中。转化菌经 IPTG 诱导后表达了分子量为 44 270 的鸽子 *leptin* 重组蛋白。经镍柱亲和层析纯化后的重组蛋白质与矿物油佐剂混合, 免疫日本大耳白兔, 制备抗 *leptin* 多克隆抗体。经过 4 次免疫之后, 获得高效价的抗 *leptin* 多克隆抗体。

**关键词:** 鸽子瘦素; 成熟肽序列; 克隆; 表达; 多克隆抗体

**中图分类号:** S836.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0155-04

## Cloning of pigeon leptin mature peptide cDNA sequence and preparations of the recombinant protein and polyclonal antibody

LEI Ming-ming<sup>1</sup>, SHAO Xi-bing<sup>2</sup>, SHI Zhen-dan<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Animal Breed Improvement and Reproduction, Institute of Animal Science Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Guangdong Province Poultry Technology, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** According to the pigeon *leptin* gene mature peptide sequence (GenBank: HG797022), the *leptin* gene were synthesized and cloned. The synthesis *leptin* gene was cloned into the sites of the plasmid pGEX-4T-1 between *Eco* R I and *Not* I to generate the expression vector pGEX-4T-1-*leptin*, which was further transformed into bacteria Arctic Express. The transformed bacteria were induced to produce recombinant leptin proteins with the expected molecular mass of 44 270 by IPTG. The recombinant leptin were purified by 50% Ni-NTA agrose chromatography and homogenized into mineral oil adjuvant. The mixers were used to immunize Japanese big ear rabbit to produce anti-leptin antibodies. Antisera with high anti-leptin titers were obtained after four immunizations.

**Key words:** pigeon leptin; mature peptide; cloning; expression; polyclonal antibody

1953 年 Kennedy 等发现脂肪组织可以分泌某

种调节体质量的激素, 该激素可通过下丘脑的代谢来调控机体的饮食摄入, 还可以接受外周组织的信号调控机体能量, 维持体质量恒定。之后有试验结果证实动物体内的确存在着这种激素<sup>[1]</sup>。直到 1994 年, Zhang 等用定位克隆技术首次克隆了小鼠的肥胖基因(*ob*)<sup>[2]</sup>。瘦素(Leptin)是 *ob* 表达的蛋白产物, 是由哺乳动物体内白色脂肪细胞分泌的 1 种多肽, 可以通过中枢神经内分泌和外周自分泌/旁

收稿日期: 2016-03-14

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, 副研究员, 主要从事动物遗传与繁殖内分泌的研究。(Tel) 02584390772; (E-mail) mm0529@163.com

通讯作者: 施振旦, (E-mail) zdshi@mail.jaas.ac.cn

分泌来调节动物的摄食、代谢、能量以及性腺的发育<sup>[3-5]</sup>。

Leptin 的一个重要功能是调控食欲,可以通过抑制下丘脑神经肽 Y 的表达来抑制摄食<sup>[6-8]</sup>,也可以通过抑制食欲肽(Orexin)的表达来抑制摄食<sup>[9]</sup>。Leptin 可以促进下丘脑中阿黑素原(POMC)的表达<sup>[10]</sup>,抑制刺鼠相关蛋白(AgRP)的表达<sup>[11]</sup>,从而调节黑素皮质受体<sup>[12]</sup>,抑制摄食,调节能量平衡<sup>[13-15]</sup>。Leptin 的另一个重要功能是促进外周能量消耗,抑制脂肪沉积。Leptin 可以促进解耦联蛋白基因 3(*UCP3*)的表达,促进产热,增加能量消耗<sup>[16]</sup>。瘦素也可以抑制过氧化物酶体增殖剂激活受体(Peroxisome proliferators-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )活化,促进脂蛋白脂肪酶合成,催化甘油三酯分解<sup>[17]</sup>。

2014 年 Friedman-Einat 等报道了鸽子 *leptin* 基因,这是第一个真正意义上鸟类的 *leptin* 基因<sup>[18]</sup>。鸽子 *leptin* 基因有 3 个外显子,其中外显子 1 是非编码的外显子,外显子 2 和 3 是编码外显子。鸽子 *leptin* cDNA 序列为 546 bp,编码 181 个氨基酸,其中前 21 个氨基酸是信号肽,成熟肽有 160 个氨基酸。本研究拟通过构建鸽子 *leptin* 基因原核表达载体,获得鸽子瘦素重组融合蛋白,并制备特异性的多克隆抗体,为鸽子 *leptin* 免疫试验和细胞生物试验奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

载体和菌株:pMD<sub>18</sub>-T 载体和 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 Arctic Express 和表达载体 pGEX-4T-1 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。

试剂和酶类:*Eco* R I 限制性内切酶、*Not* I 限制性内切酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、DL2000 分子量标准、T4 连接酶及胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司,亲和层析柱料购自 GE Healthcare 公司,表达载体 pGEX-4T-1 购自南京钟鼎生物有限公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司。

### 1.2 鸽子 *leptin* 基因序列的克隆以及重组蛋白的表达和纯化

鸽子 *leptin* 基因编码区核苷酸序列(GenBank:

HG797022)的设计引物由北京金唯智公司合成,引物中包含 *Eco* R I 和 *Not* I 酶切位点。将扩增获得的 cDNA 片段克隆插入 pMD<sub>18</sub>-T 载体,构建重组质粒 *pleptin* 并将其转入大肠杆菌细胞株中进行增殖复制,测序确认基因序列的正确性。

抽提鸽子 *leptin* 质粒并用 *Eco* R I 和 *Not* I 双酶切,经凝胶电泳分离回收 *leptin* cDNA 片段并克隆插入到 pGEX-4T-1 载体的 *Eco* R I 和 *Not* I 位点之间,获得重组质粒 pGEX-4T-1-*leptin*。将这个质粒转化到大肠杆菌 Arctic Express 中,用 IPTG 诱导表达 pGEX-4T-1-*leptin* 重组蛋白,经 12% 的 SDS-PAGE 胶验证蛋白表达和分子大小后,用镍柱亲和层析进行纯化。

### 1.3 鸽子 *leptin* 特异性多克隆抗体的制备和纯化

将纯化后的鸽子 *leptin* 重组蛋白与白油混合,制成含 1 mg/ml 重组蛋白的油乳剂,对日本大耳白兔进行肌肉注射。注射剂量为 1 只 1 ml,免疫时间为 7 d 1 次,共免疫 4 次。用 Protein A Sepharose 亲和层析柱对抗体进行纯化,并于 -20 °C 下保存。

### 1.4 ELISA 检测抗血清效价

将鸽子 *leptin* 抗原稀释至 10  $\mu$ g/ml,向 96 微孔酶标板的每个孔中加入 100  $\mu$ l 稀释后的抗原,4 °C 包被过夜。于次日倒掉包被液,用洗涤液(0.05% Tween+PBS)洗涤 3 次,加 5% 的 BSA-PBS 并于 37 °C 下封闭 1 h,洗涤 3 次后依次加免疫血清和 HRP 羊抗鸽子 IgG(1:4 000 稀释),再次进行洗涤(步骤同前)。加底物 TMB 并于 37 °C 下显色 25 min,加 2 mol/L 硫酸终止反应后读取 450 nm 的吸光值作为抗体效价。

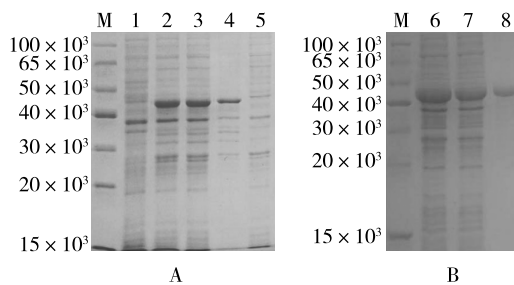
## 2 结果与分析

### 2.1 鸽子 *leptin* 基因编码成熟肽的 cDNA 克隆

根据鸽子的 cDNA 序列,利用设计的引物扩增 1 段长 477 bp 的特异序列。将该序列插入到 pMD<sub>18</sub>-T 载体构建重组质粒 *pleptin*,并将其转入到大肠杆菌细胞株中进行增殖复制,经测序证明获得的序列正确。通过 *Eco* R I 与 *Not* I 双酶切后,将鸽子 *leptin* 基因的 cDNA 片段插入到原核表达载体 pGEX-4T-1 中,获得重组表达载体 pGEX-4T-*leptin*。经 *Eco* R I 与 *Not* I 双酶切鉴定,获得长度为 477 bp 的片段。

## 2.2 鸽子 leptin 成熟肽在 *E. coli* Arctic Express 中的表达及纯化

转化重组质粒 pGEX-4T-leptin 的 *E. coli* Arctic Express 株,在 LB (AMP<sup>+</sup>) 液体培养基中培养并经 IPTG 诱导,表达出分子量约为 44 270 的鸽子 leptin 重组蛋白(图 1A),重组蛋白表达产物主要存在于沉淀中。包涵体产物经过变复性的方式,溶解在 8 mol/L 的尿素中,通过镍柱亲和纯化获得目标蛋白。纯化后的蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 分析,结果如图 1B 显示。



1:没有用 IPTG 诱导的原核表达菌总蛋白;2~3:用 IPTG 诱导后的原核表达菌总蛋白;4:用 IPTG 诱导后的原核表达菌离心后沉淀中的蛋白;5:用 IPTG 诱导后的原核表达菌离心后上清液中的蛋白;6~7:纯化前的总蛋白;8:纯化后的鸽子瘦素蛋白;M:蛋白分子量指示标准。

图 1 鸽子 leptin 重组蛋白原核表达 (A) 和纯化后蛋白的电泳图 (B)

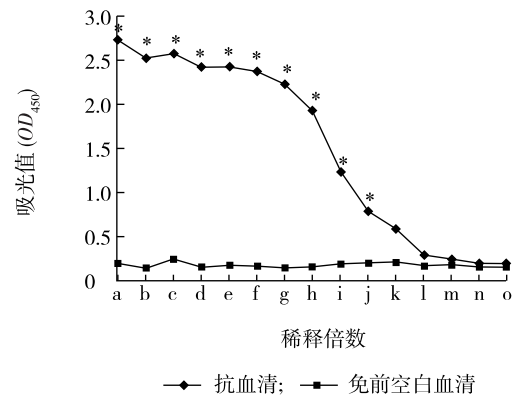
Fig.1 The expression of recombinant pigeon leptin protein (A) and SDS-PAGE analysis of the purified recombinant pigeon leptin (B)

## 2.3 ELISA 检测血清抗体效价

对日本大耳白兔进行 4 次鸽子 leptin 重组蛋白免疫之后,其血清中抗体 leptin 多克隆抗体的效价(由 ELISA 分析的 OD 值代表)如图 2 显示。免疫前血清的抗体效价始终处于较低水平,免疫 4 次后,抗体效价达到 1 : 1 024 000。

## 2.4 抗 leptin 多克隆抗体的纯化及 Western Blot 检测

含抗体的血清高速离心后,将上清液与等体积的 2×PBS 缓冲液混合,调整 pH 和离子浓度后将其缓慢加入到 Protein A Sepharose 亲和层析柱中,洗脱收集的蛋白质在 SDS-PAGE 电泳中显示较纯的单一轻链和重链条带(图 3),抗体纯度达到 96% 以上。将纯化获得的抗体作为一抗,Western Blot 检测得到



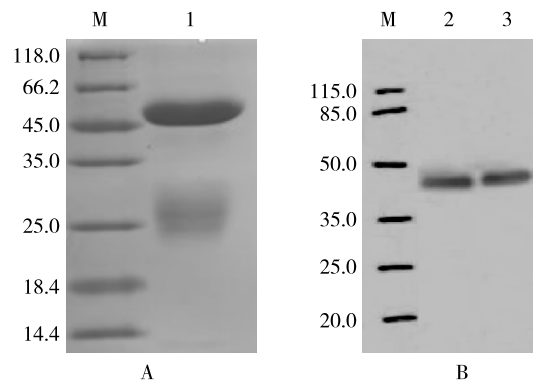
a~o 分别表示稀释倍数为:1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000、1 : 16 000、1 : 32 000、1 : 64 000、1 : 128 000、1 : 256 000、1 : 512 000、1 : 1 024 000、1 : 2 048 000、1 : 4 096 000、1 : 8 192 000、1 : 16 384 000、1 : 32 768 000。

\* 表示免疫后抗体效价与免疫前抗体效价差异显著。

图 2 日本大耳白兔血清中抗 leptin 多克隆抗体效价

Fig.2 Anti-leptin antibody titers in antiserum after immunization against leptin

分子量大小正确并且特异性好的 leptin 抗原条带。



M:标准分子量蛋白,1:纯化后的多克隆抗体;2~3:Western Blot 检测后 leptin 抗原特异性条带。

图 3 纯化后多克隆抗体的 SDS-PAGE 图 (A) 和 Western Blot 检测图 (B)

Fig.3 SDS-PAGE result of purified polyclonal antibody (A) and Western Blot analysis (B)

## 3 讨 论

乳鸽的肉厚且嫩,滋味鲜美,含粗蛋白质和无机盐等营养成分,是深受人们喜爱的佳肴。因此乳鸽养殖户开始寻找加快乳鸽生长速度的方法,提高乳鸽出栏时的体质量,增加经济效益。Shi 等对生长鸡免疫瘦素(尽管已经证实这个瘦素序列是不正确

的,但是在保守的功能区内该基因序列和现在报道的正确的瘦素序列有一定的相似性),使鸡体内产生能够中和抑制瘦素的抗体,可以显著促进鸡的采食和脂肪的沉积<sup>[19]</sup>。本研究克隆了鸽子瘦素基因 cDNA 序列,并将该 cDNA 序列插入表达质粒 pGEX-4T-1 的 *Eco* R I 与 *Not* I 位点之间,表达重组的融合蛋白。该重组蛋白含有 Gst 和 His 标签,用镍柱亲和纯化获得的目标蛋白,免疫日本大耳白兔后获得了具有特异性的抗瘦素多克隆抗体。经过多重 PCR 扩增、酶切和连接后获得阅读框架正确的表达载体,这些结果都表明分子克隆操作和重组蛋白分子表达的正确性,为动物免疫试验和实验室细胞试验等研究工作奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] COLEMAN D L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice [J]. *Diabetologia*, 1978, 14(3):141-148.
- [2] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [3] 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.
- [4] 陈蓉,李辉,施振旦.犬瘦素受体胞外近跨膜区重组融合蛋白的原核表达与纯化[J].*江苏农业学报*,2016,32(3):718-720.
- [5] 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(10):4147-4156.
- [6] HALAAS J L, GAJIWALA K S, MAFFEI M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene [J]. *Science*, 1995, 269:543-546.
- [7] 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.
- [8] WANG Q, BING C, AL-BARAZANJI K, et al. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat [J]. *Diabetes*, 1997, 46(3):335-341.
- [9] NIIMI M, SATO M, TAMINATO T. Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin [J]. *Endocrine*,2001, 14(2):269-273.
- [10] ABBOTT C R, ROSSI M, KIM M S, et al. Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake: lack of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor [J]. *Brain Res*, 2000, 869(1/2):203-210.
- [11] KORNER J, SAVONTAUS E, CHUA S C, et al. Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus [J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13(11):959-966.
- [12] LEE M, KIM A, CONWELL I M, et al. Effects of selective modulation of the central melanocortin-3-receptor on food intake and hypothalamic POMC expression [J]. *Peptides*, 2008, 29(3):440-447.
- [13] 张楠楠,白康,陈辉,等.外源瘦素对蛋鸡能量代谢及 *OB-R* 基因表达的影响 [J].*江苏农业科学*, 2015,43(8):198-201.
- [14] DUAN J, CHOI Y H, HARTZELL D, et al. Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice [J]. *Obesity*,2007,15(11):2624-2633.
- [15] 解菲菲,曹诣斌.鱼类瘦素受体研究进展 [J].*南方农业学报*, 2015,46(9):1726-1730.
- [16] RICQUIER D, BOUILLAUD F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance [J]. *J Physiol*,2000, 529(1):3-10.
- [17] SATO K, FUKAO K, SEKI Y, et al. Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration [J]. *Poult Sci*, 2004, 83(8):1342-1347.
- [18] FRIEDMAN-EINAT M, COGBURN L A, YOSEFI S, et al. Discovery and characterization of the first genuine avian leptin gene in the rock dove (*Columba livia*) [J]. *Endocrinology*, 2013, 155(9): 3376-3384.
- [19] SHI Z D, SHAO X B, CHEN N, et al. Effects of immunisation against leptin on feed intake, weight gain, fat deposition and laying performance in chickens [J]. *Br Poult Sci*, 2006, 47(1):88-94.

(责任编辑:王妮)