

抗重组猪三十九肽胆囊收缩素卵黄抗体的制备

曹 军^{1,2}, 徐建生¹, 成大荣¹, 孙怀昌¹, 唐 波¹

(1 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009; 2 南通大学 生命科学院, 江苏 南通 226007)

[摘 要] 制备重组猪三十九肽胆囊收缩素(GST-CCK39), 以其为抗原免疫 28 周龄的蛋鸡, 用水稀释脱脂处理, 聚乙二醇(PEG)一步法制备高效价卵黄抗体, 并用免疫琼脂扩散试验、ELISA、Dot-ELISA 检测其效价及特异性。结果表明, 免疫琼脂扩散测得特异性抗体效价达 1:16 以上, ELISA 效价达 1:12 800 以上; Dot-ELISA 显示所获得卵黄抗体具有较强的特异性; 高效价、特异性的卵黄抗体可维持 50 d 以上。表明用重组蛋白 GST-CCK39 免疫蛋鸡后能获得效价高、特异性强的卵黄抗体。

[关键词] GST-CCK39; 融合蛋白; 卵黄抗体; 猪

[中图分类号] S816.79

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0035-04

Preparation of hen egg yolk immunoglobulin (IgY) against recombinant Cholecystokinin-39 of pig

Cao Jun^{1,2}, Xu Jian-sheng¹, Cheng Da-rong¹, Sun Huai-chang¹, Tang Bo¹

(1 Veterinary College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2 College of Life Sciences, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226007, China)

Abstract: In order to prepare the immunoglobulin Y for the fusion protein GST-CCK39, hens were immunized with partially purified fusion protein GST-CCK39. One-step polyethylene glycol (PEG) precipitation procedure was used to purify the immunoglobulin Y (IgY). The titers of purified IgY were detected by Agar Gel Precipitation Test (AGPT), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Dot-ELISA. Results showed that the AGPT titer in the IgY was higher than 1:16; the ELISA titers in the purified IgY was higher than 1:12 800. High titers IgY to GST-CCK39 could be induced by immunization successfully, and the specific activity could last more than 50 days. All these indicated that the good specificity and high titers hen egg yolk immunoglobulin (IgY) could be prepared by fusion protein GST-CCK39.

Key words: GST-Cholecystokinin-39 (GST-CCK39); fusion protein; hen egg yolk immunoglobulin (IgY); pig

胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)是一种广泛分布于消化系统、中枢及外周神经系统的脑肠肽, 1928 年首先由 Ivy 和 Olberg 在狗的胃肠道中发现^[1]。作为胃肠激素和神经肽, CCK 对消化系统和神经系统具有双重调节作用。CCK 对消化功能的影响主要是直接抑制胃酸的分泌, 抑制进食后的胃

排空, 并通过外周及中枢神经系统抑制胃运动^[2]; 同时作为一种内源性生理饱感信号, 抑制摄食行为^[3]。CCK 抗体在降低动物内源性 CCK 含量, 提高摄食能力等方面发挥着重要作用^[4]。

CCK 是一类长短不同的多肽分子的总称, 目前发现的 CCK 分子活性形式有 CCK85、CCK39、

†收稿日期: 2006-09-05

〔作者简介〕 曹 军 (1974-), 男, 江苏南通人, 讲师, 主要从事微生物与免疫学研究。E-mail: CJ7445@ntu.edu.cn

〔通讯作者〕 徐建生 (1963-), 男, 江苏泰兴人, 副教授, 主要从事微生物与免疫学研究。

CCK33、CCK12、CCK8 和 CCK5 等。在胃肠道中, CCK 主要以 CCK33 和 CCK39 两种形式存在, 其中 CCK39 较 CCK33 稳定得多, 常用于制备抗体^[5]。

近年来, 用 CCK 免疫动物降低内源性 CCK^[6-7], 或用抗 CCK 卵黄抗体直接作为饲料添加剂来提高动物摄食量、促进动物生长^[8] 均获得较好的效果。但目前制备 CCK 抗体的免疫抗原主要是人工合成的 CCK8, 其价值昂贵且必须耦联一定分子量的蛋白才有抗原性^[9]。为寻求一种价格低廉, 抗原性较好的 CCK, 本研究以重组猪三十九肽胆囊收缩素 (GST-CCK39) 为抗原免疫开产蛋鸡, 制备特异性抗 GST-CCK39 卵黄抗体, 并对其免疫原性进行了研究, 以期为进一步大量制备 CCK 卵黄抗体作为饲料添加剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、宿主菌和实验动物 含猪 CCK39 基因的重组质粒 p GEX-CCK39, 由曹军等^[10] 构建并保存; p GEX-6p-1 质粒和大肠杆菌 *E. coli* BL21, 购自 Pharmacia 公司。试验用蛋鸡为 3 只新扬州鸡, 28 周龄, 由扬州大学实验场提供。

1.1.2 主要试剂 谷胱甘肽活化的 Sepharose 4B Redipack (2 mL ×2), 购自 Pharmacia 公司; CCK8 标准品种兔抗鸡 IgG HRP, 购自 Sigma 公司; IPTG, 购自 TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产分析纯级。

1.2 猪 GST-CCK39 抗原的制备

含重组质粒 p GEX-CCK39 的 *E. coli* BL21 诱导、表达及表达产物 (GST-CCK39) 的初步纯化参考文献 [10] 进行, 用 SDS-PAGE 测定纯化产物的浓度。取表达产物包涵体悬浮液分别与等量的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂充分乳化, 制备 CCK39 抗原, 备用。

1.3 猪 GST-CCK39 抗体的制备

对 3 只 28 周龄蛋鸡翅静脉采血, 分离血清, 并收集鸡蛋作为试验对照。开产后第 3 天, 蛋鸡用弗氏完全佐剂乳化抗原胸肌多点注射免疫, 剂量 100 μg/只。首次免疫后 1 周用弗氏不完全佐剂乳化抗原进行二免, 免疫剂量 200 μg/只。二免后每隔 15 d 用含重组质粒 p GEX-CCK39 的 *E. coli* BL21 诱导表达产物包涵体悬浮液加强免疫 1 次, 共加强免疫 2 次, 免疫剂量均为 200 μg/只。加强免疫 1 个月, 用表达产物包涵体悬浮液再进行免疫, 免疫剂量为 400 μg/只。从首次免疫开始, 每次免疫后 7 天翅静脉采血分离血清, 并收集每天的鸡蛋待检。

1.4 猪 GST-CCK39 鸡血清抗体和卵黄抗体的检测

将诱导表达后的含重组质粒 p GEX-CCK39 的 *E. coli* BL21 菌体用超声波裂解仪裂解, 裂解强度 20 kHz, 裂解产物 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清并用谷胱甘肽活化的 Sepharose 4B 亲和层析柱纯化表达产物 (GST-CCK39)。收集洗脱液用 PBS 透析过夜, 再用 PEG8000 浓缩备用。取少量浓缩液进行 120 g/L SDS-PAGE 电泳, 检测纯化效果。

以纯化的 GST-CCK39 为抗原, 用免疫琼脂双扩散法检测鸡血清抗体效价。依据蛋鸡血清抗体效价对免疫后每隔 10 d 所产鸡蛋, 用琼脂双扩散方法检测卵黄抗体的效价。

1.5 猪 GST-CCK39 卵黄抗体的提取

根据猪 GST-CCK39 鸡卵黄抗体免疫琼脂双扩散检测结果, 当卵黄液中抗猪 GST-CCK39 的抗体效价达到 1 16 时, 参照聚乙二醇-8000 (PEG-8000) 一步法^[11] 提纯卵黄抗体, PEG-8000 的质量浓度分别为 60, 70, 80, 90 和 100 g/L。将提取的卵黄抗体过滤除菌, 取少量滤液进行 100 g/L SDS-PAGE 电泳, 余液 4℃ 保存备用。

1.6 抗 CCK39 卵黄抗体的 ELISA 检测

以纯化的 GST-CCK39、CCK8 标准品为抗原包被聚丙烯酶标板 (ELISA 板)。GST-CCK39 包被按常规方法进行, CCK8 包被方法参考文献 [12]。将宿主菌 *E. coli* BL21 IPTG 诱导表达的菌体裂解物 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清包被聚丙烯酶标板 (ELISA 板) 作为对照。以初步提取的卵黄抗体为一抗, 以兔抗鸡 IgG HRP 为二抗, 检测卵黄抗体的效价。

1.7 猪 GST-CCK39 卵黄抗体的 Dot-ELISA 检测

剪取适当大小的聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 用直尺将其分成 0.25 cm² 大小的正方形网格, 将膜在无甲醇中浸泡 5~10 min, 蒸馏水清洗 3 遍, 37℃ 培养箱烘至膜上水珠消失, 膜保持湿润。在 PVDF 膜的网格上点样, 点样顺序为: 表达产物的裂解液离心上清 10 μL, 0.1 μg/μL CCK8 标准品溶液 10 μL, 0.25 μg/μL 猪 GST-CCK39 纯化蛋白溶液 10 μL, PBS 10 μL, 自然风干, 用质量浓度为 0.005 g/L, pH 值 7.4 的 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。用 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBST 封闭液封闭 2 h, 以 1 1 000 (体积比) 倍粗提卵黄抗体为一抗, 37℃ 感作 2 h; 兔抗鸡 IgG HRP 为二抗 (1 1 000 稀释), 37℃ 感作 2 h, PBST 洗涤, 转移至新鲜配制得底物显色液 (10 mL PBS + 9 mg DAB + 20 μL + 体积分数 30% H₂O₂) 中, 避光显色 30 min, 漂洗 3 遍, 烘干, 拍照或肉眼观察。

2 结果与分析

2.1 猪 GST-CCK39 鸡血清抗体和卵黄抗体的效价

2.2.1 血清抗体效价 由表 1 可知,1 号鸡用猪

GST-CCK39 免疫后,血清中未检测到抗体,2 号和 3 号鸡用猪 GST-CCK39 免疫后分别在 29 d 和 14 d 检测到抗体。

表 1 鸡血清中抗 CCK39 抗体的效价
Table 1 Titers of anti-CCK39 antibody in hens' serum

编号 Serial number	首次免疫后时间/d Day after the first immune						
	- 3	0	7	14	29	44	72
1 号鸡 Hen 1	-	-	-	-	-	-	-
2 号鸡 Hen 2	-	-	-	-	1 8	1 16	1 16
3 号鸡 Hen 3	-	-	-	1 4	1 16	1 16	1 16

注:- 表示阴性反应。下表同。
Note:- showed posituve result. The same as below.

2.1.2 卵黄抗体效价 由表 2 可知,1 号鸡免疫后卵黄中未检测到抗体,2 号和 3 号鸡免疫后 20 d 在

卵黄中检测到抗体。琼脂双扩散检测结果表明,抗体效价在 1 16 以上维持时间可达 50 d 以上。

表 2 鸡卵黄抗体中抗 CCK39 抗体的效价
Table 2 Titers of anti-CCK39 IgY in hens' egg

编号 Serial number	首次免疫后时间/d Day after the first immunity										
	- 3	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1 号鸡 hen 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 号鸡 hen 2	-	-	-	1 4	1 8	1 16	1 16	1 32	1 16	1 16	1 16
3 号鸡 hen 3	-	-	-	1 8	1 16	1 32	1 32	1 32	1 32	1 16	1 16

2.2 猪 GST-CCK39 卵黄抗体的初步提取结果

结果(图 1)显示,用 60 ,70 ,80 和 90 g/L 的 PEG-8000 提取卵黄抗体时出现 3 个主要条带,相对分子质量分别为 66,46 和 35 ku,此结果与 Bizhanov 等^[13]结果基本一致。

2.3 粗提猪 GST-CCK39 卵黄抗体的 ELISA 检测结果

结果表明,随 PEG-8000 浓度的增大,卵黄抗体的效价随之升高(表 3)。但 PEG-8000 浓度的增大,透析除去沉淀物中 PEG 的难度也随之加大,所以本试验确定 80 g/L PEG-8000 为鸡抗 CCK39 卵黄抗体的最佳提取浓度。

表 3 不同质量浓度 PEG-8000 提纯的猪 GST-CCK39 卵黄抗体的间接 ELISA 效价

Table 3 Titers of purified anti-CCK39 IgY (indirect ELISA)

PEG-8000 浓度/(g ·L ⁻¹) Concentration of PEG-8000	抗原种类 Antigen species		
	GST-CCK39	CCK8	BL21 裂解物上清 BL21 of lysate's upper liquid
60	1 2 ¹²	1 6 400	-
70	1 2 ¹⁴	1 12 800	-
80	1 2 ¹⁶	1 12 800	-
90	1 2 ¹⁸	1 25 600	-
100	1 2 ¹⁸	1 25 600	-

2.4 鸡抗 CCK39 卵黄抗体的 Dot-ELISA

Dot-ELISA 结果(图 2)显示,所制备的抗体能与 CCK8 标准品、纯化的 GST-CCK39 发生反应,有可见斑点形成,与 BL21 IPTG 诱导的裂解产物上清不发生反应,无斑点形成。

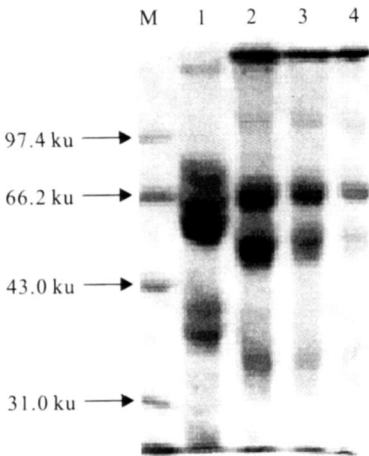


图 1 不同浓度 PEG-8000 提取卵黄抗体的 SDS-PA GE
M. 低分子量蛋白质标准;1~4. 分别为 90,80 ,
70 和 60 g/L PEG-8 000 提取的卵黄抗体
Fig.1 SDS-PA GE analysis of purified IgY
M.Low molecular weight marker ;1- 4. Purified IgY by 90 g/L ,
80 g/L ,70 g/L and 60 g/L PEG-8000 ,respectively

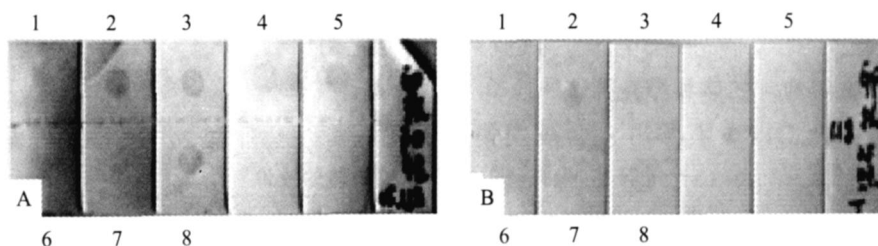


图 2 鸡抗 CCK39 卵黄抗体的 Dot-ELISA

A. 一抗为免疫鸡卵黄抗体;B. 一抗为未免疫鸡卵黄抗体;1. PBS 空白对照;2. 未纯化的 GST-CCK39;
3~4. 纯化的 GST-CCK39;5. CCK8 标准品;6. BL21 IPTG 诱导的裂解物;7~8. pET-CCK39 的裂解物上清

Fig. 2 Dot-ELISA analysis of purified IgY

A. The primary antibodies were IgY of immunized hens; B. The primary antibodies were IgY of unimmunized hens.

1. PBS blank control; 2. Unpurified GST-CCK39; 3 - 4. Purified GST-CCK39; 5. CCK8 standard sample; 6. Induced BL21 with IPDG of lysate; 7 - 8. Induced pET-CCK39 with IPTG of lysate's upper liquid

3 讨 论

本试验采用 ELISA、Dot-ELISA 法检测了制备的抗猪 GST-CCK39 卵黄抗体的效价,结果显示未提纯的卵黄抗体效价明显高于初步提纯的卵黄抗体,但卵黄中成分复杂,用 ELISA 进行效价测定时,对照用卵黄液和未提纯的抗 CCK 卵黄液 ELISA 反应显色差异不明显。所以在检测所制备的抗 CCK39 卵黄抗体的效价和特异性时,须对卵黄液进行提纯以减少卵黄中非特异成分的干扰。

本试验结果显示,运用 GST-CCK39 作为免疫原制备特异性卵黄抗体时,存在着个体差异,免疫程序的优化将是下一步研究的重点。国内外学者在研究胆囊收缩素的作用机制及制备其抗体时,主要以 CCK8 作为研究材料,Pekas^[9]认为 CCK8 分子量太小,必须选择合适的载体交联后才有免疫原性。这样既增加了成本,又增加了实验操作的难度。考虑到 CCK 在动物消化道中主要以 CCK33 和 CCK39 两种大分子的形式存在,且 CCK39 较 CCK33 稳定的多,本试验应用分子克隆技术成功表达了 GST-CCK39 融合蛋白,并成功制备了卵黄抗体,为开发 CCK 抗体饲料添加剂奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Ivy A C, Olberg E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation[J]. American Journal of Physiology, 1928, 86: 599-613
- [2] Crawley J N, Corwin R L. Biological actions of Cholecystokinin [J]. Peptide, 1994, 15: 731-755.
- [3] Gibbs J, Young R C, Smith G P. Cholecystokinin decreases food intake in rats [J]. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 1973, 84: 488-495.
- [4] Dang M H. Studies show benefits of Cholecystokinin antibodies [J]. Feedstuffs, 1998, 2: 12-16.
- [5] 孔凡德, 郑秋风, 刘建新. 胆囊收缩素及其在动物生产中的应用 [J]. 饲料研究, 2002, 8: 7-11.
- [6] Pekas J C, Trout W E. Cholecystokinin octapeptide immunization effect on growth of barrows and gilts [J]. Journal of Animal Sciences, 1993, 71: 2499-2505.
- [7] Pekas J C. Effect of Cholecystokinin immunization enhanced food intake and growth of swine on lean yield and carcass composition [J]. Journal of Nutrition, 1991, 121: 563-567.
- [8] 丁雪梅, 张克英, 陈代文. 含 CCK 抗体的卵黄粉对肉鸡生产性能的影响 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22: 192-195.
- [9] Pekas J C. Immunization of Cholecystokinin octapeptide - conjugated antigens in pigs [J]. Journal of Animal Sciences, 1996, 74: 1953-1958.
- [10] 曹 军, 成大荣, 徐建生, 等. 猪三十九肽胆囊收缩素(CCK39)基因的克隆和表达 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 612-615.
- [11] 王辉龙, 周建武, 王中来, 等. 聚乙二醇一步沉淀提取卵黄抗体 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2001, 29(5): 123-126.
- [12] 何 涛, 陈曼玲. 胆囊收缩素酶联免疫测定法的研究 [J]. 华西医科大学学报, 1998, 29(2): 220-223.
- [13] Bizhanov G, Vyshniauskis G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus [J]. Veterinary Research Communications, 2000, 24: 103-113.