

DOI:CNKI:61-1390/S.20111021.1707.021

网络出版时间:2011-10-21 17:07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111021.1707.021.html>

鸡 *PLA2* 基因的克隆与原核表达及 *PLA2* 蛋白卵黄抗体的制备

杨涵江, 辛 颖, 麻丽霞, 张智英

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】** 克隆并原核表达鸡 *PLA2* 基因, 小量制备鸡 *PLA2* 卵黄抗体, 为大规模制备 *PLA2* 卵黄抗体作为饲料添加剂提供参考。 **【方法】** 提取鸡胰脏总 RNA, 利用 RT-PCR 方法获得鸡 *PLA2* 基因, 将其克隆至 pGEX-4T-1 原核表达载体中, 构建表达载体 pGEX-4T-1-*PLA2*, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达 GST-*PLA2* 融合蛋白。将 GST-*PLA2* 融合蛋白免疫青年蛋鸡, 每次 0.3 mg/只, 共免疫 4 次, 收集鸡蛋, 提取卵黄抗体, 采用 Western Blotting 检测抗体的特异性。 **【结果】** 成功克隆出了鸡 *PLA2* 基因, 构建了 pGEX-4T-1-*PLA2* 原核表达载体, 并诱导表达了分子质量为 44.59 ku 的 GST-*PLA2* 融合蛋白。GST-*PLA2* 融合蛋白免疫蛋鸡后获得了卵黄抗体, 经 Western Blotting 检查, 制备的卵黄抗体具有很好的特异性。 **【结论】** 构建了表达鸡 *PLA2* 基因的表达系统, 并成功的制备了抗鸡 *PLA2* 的卵黄抗体。

【关键词】 鸡; *PLA2* 基因; 原核表达; 卵黄抗体

【中图分类号】 S816.75; S852.4⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)11-0048-05

Cloning and expression of chicken *PLA2* gene and preparation of hen egg yolk immunoglobulin against chicken *PLA2*

YANG Han-jiang, XIN Ying, MA Li-xia, ZHANG Zhi-ying

(College of Animal Science & Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research prepared the high titer and specific hen egg yolk immunoglobulin (IgY) against chicken *PLA2*. **【Method】** Gallus gallus phospholipase A2 gene was amplified by RT-PCR, inserted into vector pGEX-4T-1, and expressed in recombinant *E. coli* strain BL21(DE3). The GST-*PLA2* fusion protein was isolated from the bacteria cells and injected into hens at 300 μ g dose four times. Western blotting was performed to detect antibodies in egg yolk. **【Result】** The chicken *PLA2* gene was cloned and inserted into expression vector pGEX-4T-1. The fusion protein GST-*PLA2* was expressed in *E. coli*, and relative molecular mass of fusion protein was 44.59 ku. After injecting fusion protein into hen, we collected eggs and extracted IgY. Western blotting was used to show that the IgY was specific. **【Conclusion】** The expression system pGEX-4T-1-*PLA2* could express recombinant protein GST-*PLA2*, and the prepared IgY had a good immunized specificity.

Key words: chicken; *PLA2* gene; prokaryotic expression; hen egg yolk immunoglobulin

磷脂酶 A2 (Phospholipase A2, PLA2, EC3. 1.1.4) 是一种脂解酶, 可特异水解糖磷脂 2 位酰基

* [收稿日期] 2011-05-05

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新重大专项(2009ZDKG-18)

[作者简介] 杨涵江(1985—), 男, 四川新都人, 在读硕士, 主要从事抗体制备及转基因动物研究。

[通信作者] 张智英(1958—), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物基因组学、动物病毒及其在癌症治疗中的应用研究。

部位,产生自由脂肪酸和溶血磷脂 2 种代谢物^[1-2]。PLA2 水解磷脂释放的自由脂肪含有大量的花生四烯酸,其经环氧物酶和脂氧化物酶代谢,主要形成前列腺素(PGE)、白三烯和脂毒素类,这些物质直接或间接作用于靶细胞参与炎症反应^[3-4]。因此,长期以来人们认为 PLA2 在炎症中扮演的角色是破坏细胞膜的稳定性,促进长链脂肪酸(如花生四烯酸、PGE 等)释放,使炎症组织损伤,具有负面作用^[5-7]。肠道中的炎症反应主要是由胰脏分泌的 PLA2 介导的,在肠道产生炎症反应的生理生化过程中要消耗大量的能量,这对动物生产很不利^[8],所以通过人为的方法降低动物肠道中炎症反应的程度,可以减少动物生产过程中维持代谢消耗的能量,提高生产效益。有报道称,选用鸡胰脏 PLA2 作为靶标制备卵黄抗体,将抗鸡胰脏 PLA2 的卵黄抗体做为鸡饲料添加剂,可抑制肠道 PLA2 的活性,并会很大程度地降低鸡生产过程中的维持消耗,从而提高鸡的生产性能^[9],该类研究已在美国进行了近十年,并取得了良好的结果,如在猪上提高了 5%~10% 的生产性能^[9],在鱼上则达到 25%~30%^[10],但是类似的研究在国内尚比较少。为此,本研究对鸡 PLA2 基因进行了克隆、原核表达,制备了 PLA2 的卵黄抗体,并对其免疫原性进行了研究,以期为进一步大量制备 PLA2 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、样品和试验动物 质粒 pGEX-4T-1、pGEX-4T-1-PLA2 和菌株 *E. coli* JM109、BL21(DE3),均由西北农林科技大学动物科技学院动物基因组学实验室保存。新鲜鸡胰脏样品(约 2 g),采自市购肉鸡。试验用蛋鸡为 3 只 17 周龄莱杭蛋鸡。

1.1.2 主要试剂 Trizol,购自 invitrogen 公司; *pfu* DNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶,购自 TaKaRa 公司;辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗鸡抗体及 DAB 显色试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,购自 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯级试剂。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 公布的鸡 PLA2 基因的序列(GenBank 登录号:XM_415272),设计 1 对引物用,于鸡 PLA2 基因的扩增,其中上游引物序列:5'-GCGAATTCATGAAGACTCTTGCGTGCT-3';下游引物序列:5'-GCAAGCTTA

CTGCTGCAGTATTTCTTCT-3',上下游引物序列中的粗体部分分别为 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.2 鸡 PLA2 基因的克隆

1.2.1 鸡胰脏组织总 RNA 的提取、反转录及 PLA2 基因的扩增 取鸡胰脏组织 0.2 g,用 Trizol 法提取其总 RNA,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,使用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链。以合成的 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增,反应总体积为 50 μ L,其中 10 $\times$ Buffer (含 MgCl₂) 5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 4 μ L,上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L, *pfu* DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 0.5 μ L,灭菌水 38.5 μ L。PCR 反应程序为:94.0 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 PCR 产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 pGEX-4T-1-PLA2 表达载体的构建 将经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 PCR 产物连接到同样用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 pGEX-4T-1 载体中,构建重组表达载体 pGEX-4T-1-PLA2,将其转化大肠杆菌 JM109,涂布于含氨苄的固体培养基中过夜培养。次日挑取单克隆,摇菌,提取质粒,进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。将得到的阳性克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,并将测序结果与 GenBank 公布的鸡 PLA2 基因序列(GenBank 号:XM_415272)进行对比。

1.3 PLA2 基因在大肠杆菌中的表达及表达产物的 SDS-PAGE 分析

将测序正确的 pGEX-4T-1-PLA2 载体转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h,挑取单克隆于 3 mL LB 中,37 $^{\circ}$ C、250 r/min 过夜摇菌;按体积比 1:50 接种到 100 mL 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇菌培养至菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h。取表达产物,于 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min,收集菌体沉淀,PBS 重悬;冰上超声破碎,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液及包涵体沉淀,包含体沉淀用 PBS 洗 2 次,分别收集每次洗涤的上清液及沉淀备用。将获得的原始菌液、细胞破碎后的上清液和沉淀、PBS 洗涤 2 次的上清液以及最终的包涵体蛋白,分别与 2 $\times$ SDS 上样缓冲液等体积混合,100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后用 120 g/L SDS-PAGE 进行电泳检测。

1.4 卵黄抗体的制备

1.4.1 鸡 PLA2 抗原的制备 将包涵体进行 SDS-PAGE 电泳,随后使用 0.3 mol/L KCl 染色 10 min,切下目的条带,放入预冷研钵中,加入液氮研磨成粉末状,重悬于 PBS,并与等量弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂充分乳化,制备 PLA2 抗原。

1.4.2 皮下免疫蛋鸡 在注射 PLA2 抗原前先收集 3 d 鸡蛋作为对照组,然后皮下多点注射弗氏完全佐剂乳化的 PLA2 抗原进行首次免疫,剂量 0.3 mg/只。首次免疫后 2 周用弗氏不完全佐剂乳化的 PLA2 抗原进行加强免疫,剂量 0.3 mg/只,加强免疫共进行 3 次,每次间隔 7 d。从首次免疫开始,每天收集鸡蛋待检。

1.4.3 卵黄抗体的分离 参考前人的硫酸铵沉淀法^[11-12]并稍作修改进行试验。将卵黄从鸡蛋中剥离出来,用灭菌的玻璃棒捣碎,然后用尼龙网过滤;用 pH 5.0 的醋酸溶液将过滤后的卵黄稀释 10 倍,4 ℃ 静置过夜;收集上清液,缓缓加入饱和硫酸铵至质量浓度为 450 mg/L,随后在磁力搅拌器上搅动 30 min;4 ℃、10 000 g 离心 10 min,弃上清液,将沉淀重悬于 10 mL 蒸馏水中;再次缓缓加入饱和硫酸铵至质量浓度为 400 mg/L,搅动 30 min,4 ℃、10 000 g 离心 10 min,弃上清液,将沉淀重悬于 10 mL PBS

中,备用。

1.5 卵黄抗体的 Western Blotting 检测

取原核表达的蛋白样品,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后将蛋白电转移至 PVDF 膜上(60 V 转膜约 2 h),用 50 g/L 的脱脂奶粉封闭过夜,TBST 洗涤 3 次;以重悬于 PBS 中的卵黄抗体为一抗(稀释 1 000 倍),37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次;用以 HRP 标记的羊抗鸡 IgY 作为二抗(稀释 5 000 倍),37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗涤 6 次;最后进行 DAB 显色分析。

2 结果与分析

2.1 鸡 PLA2 基因的克隆与原核表达载体的构建

鸡胰脏总 RNA 提取结果(图 1)显示,28S 与 18S RNA 条带完整清晰,说明总 RNA 提取的质量较好,可用于反转录。以胰脏 cDNA 为模板,PCR 扩增鸡 PLA2 基因,结果在约 460 bp 处有条带出现(图 2),与预期一致。pGEX-4T-1-PLA2 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切结果显示,获得了约 460 bp 的插入片段(图 3),与预期结果相一致。测序比对结果显示,本试验扩增出的鸡 PLA2 基因与 GenBank 公布的鸡 PLA2 基因序列(GenBank 号:XM_415272)完全一致。

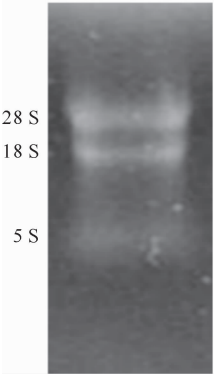


图 1 鸡胰脏组织总 RNA 的提取
Fig.1 Extraction totle RNA of chicken pancreas tissue

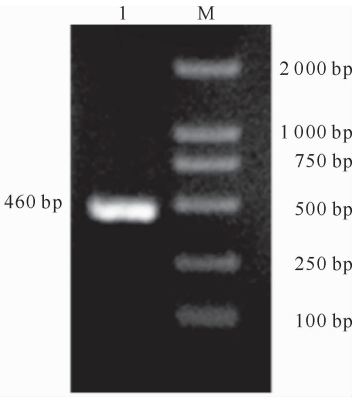


图 2 鸡 PLA2 基因的 PCR 扩增
1. PCR 产物;M. DNA Marker
Fig.2 Amplification of chicken PLA2 gene
1. Produce of PCR;M. DNA Marker

2.2 鸡 PLA2 基因的原核表达

载体 pGEX-4T-1-PLA2 中 GST-PLA2 融合蛋白共计 389 个氨基酸,分子质量为 44.59 ku。由图 4 可知,表达载体 pGEX-4T-1-PLA2 经 IPTG 诱导后,在约 45 ku 处有特异性蛋白条带出现;表达的蛋白只在菌体破碎后的沉淀中存在,上清液中不存在,用 PBS 洗涤 2 遍后,沉淀中绝大部分蛋白均是目标

蛋白。

2.3 卵黄抗体的 Western Blotting 检测

Western Blotting 印记检测结果显示,1 000 倍稀释的卵黄抗体溶液能够检测到分子质量为 44.59 ku 的融合蛋白(图 5),说明所制备的卵黄抗体中抗鸡 PLA2 蛋白的抗体含量较高,且抗体具有特异性和免疫原性。

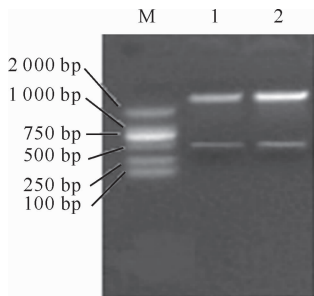


图 3 原核表达载体 pGEX-4T-1-PLA2 的双酶切鉴定
1,2. *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切载体 pGEX-4T-1-PLA2;M. DNA Marker

Fig. 3 Identification of prokaryotic expression vector pGEX-4T-1-PLA2
1,2. *EcoR* I and *Hind* III Digestion of pGEX-4T-1-PLA2;M. DNA Marker

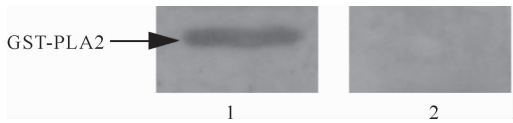


图 5 抗 GST-PLA2 融合蛋白卵黄抗体的 Western Blotting 检测
1. 加强免疫后的卵黄抗体;2. 初免前的卵黄抗体(阴性对照)

Fig. 5 Western Blotting detection for the presence and specificity of IgY against the GST-PLA2 fusion protein
1. IgY isolated from the eggs of treatment hens;
2. IgY prepared from eggs before immunization

3 讨 论

卵黄抗体是从经过免疫注射特定抗原的产蛋鸡卵黄中提取的免疫球蛋白。卵黄抗体具有产量高、制备简单、生产成本低、便于大规模产业化生产等特点,并且理化性质稳定,具有一定的抗酶解能力^[13]。基于上述特点,将卵黄抗体开发为饲料添加剂得到了较为广泛的研究^[14-16]。在以前的报道中制备卵黄抗体作为饲料添加剂的目的主要是用于提高动物肠道的免疫力^[15-16],而在本试验制备的抗 PLA2 卵黄抗体是用于降低动物肠道的免疫反应。在本研究中,通过原核表达 PLA2 抗原的方法制备了抗 PLA2 的卵黄抗体,与前人从胰脏分离 PLA2 蛋白免疫蛋鸡获得抗 PLA2 卵黄抗体的方法^[9-10]相比,本方法大幅降低了制备 PLA2 抗原的成本。本试验成功地进行了 PLA2 基因的原核表达,获得了抗

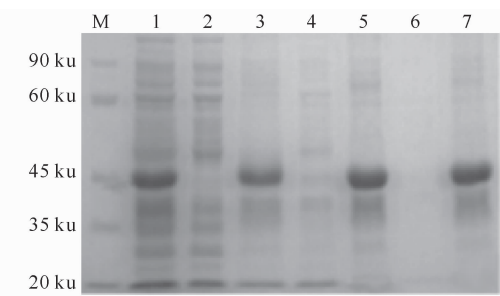


图 4 GST-PLA2 融合蛋白的诱导表达
M. 蛋白 Marker;1. 大肠杆菌裂解后上样;2. 裂解后上清;
3. 裂解后沉淀;4,5. 分别为第 1 次洗涤后的上清液和沉淀;
6,7. 分别为第 2 次洗涤后的上清液和沉淀

Fig. 4 GST-PLA2 recombinant protein was separated on SDS-PAGE, stained with coomassie brilliant blue, and marked by an arrow
M. Protein marker;1. Whole cell lysate of bacteria;
2. Supernatant after sonication of cells;3. Inclusion bodies;
4,5. Supernatant and sediment from the first washing solution of inclusion bodies respectively;6,7. Supernatant and sediment from the second washing solution of inclusion bodies

PLA2 的卵黄抗体,为下一步开发 PLA2 卵黄抗体饲料添加剂奠定了基础。

[参考文献]

[1] Dennis E A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2 [J]. J Biol Chem, 1994, 269 (18): 13057-13060.

[2] Six D A, Dennis E A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1488 (1): 1-19.

[3] Bell J G, MacKinlay E E, Dick J R, et al. Glen, essential fatty acids and phospholipase A2 in autistic spectrum disorders [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004, 71 (4): 201-204.

[4] Wilensky R L, Shi Y, Mohler E R, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development [J]. Nat Med, 2008, 14 (10): 1059-1066.

[5] Balsinde J, Balboa M A, Insel P A, et al. Regulation and inhibition of phospholipase A2 [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39: 175-189.

[6] Macdonald T, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut [J]. Science, 2005, 307 (5717): 1920-1925.

[7] Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2 [J]. J Biochem, 2002, 131 (3): 285-292.

[8] Cook M E. Antibodies alternatives to antibiotics in improving growth and feed efficiency [J]. J Appl Poult Res, 2004, 13 (1): 106-119.

[9] Danny, Hooge M. Antibody egg product aids growth, efficiency; specific egg antibody products may influence broiler and

swine growth and efficiency [J]. Feed stuffs,2006,78(3):2.

[10] Terence P, Yang M. Effects of anti-phospholipase A2 on the growth of rainbow trout [J]. American Fisheries Society, 2008,70(2):236-239.

[11] Hansen P, Scoble J A, Hanson B, et al. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography [J]. J Immunol Methods, 1998,215(1):1-7.

[12] Akita E M, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification [J]. J Food Sci, 1992,57(3):379-385.

[13] 张小莺, 郑礼, Schade R, 等. 免疫鸡产生 IgY 抗体的技术 [J]. 中国药理学通报, 2004,20(10):1102-1106.

Zhang X Y, Deng L, Schade R, et al. Technological aspects of egg yolk immunoglobulin [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2004,20(10):1102-1106. (in Chinese)

[14] 奈冰, 林晓钦. 含胆囊收缩素抗体卵黄粉对断奶仔猪生产性能及养分消化率的影响 [J]. 中国饲料, 2009(1):19-25.

Nai B, Lin X Q. Effects of egg yolk containing cholecystokinin-antibody on growth performance and nutrient digestibility of weanling piglet [J]. China Feed, 2009(1):19-25. (in Chinese)

[15] 王吉潭, 李德发, 龚丽敏, 等. 高免全蛋粉对早期断奶仔猪生产性能、肠道组织形态的研究 [J]. 饲料研究, 2004(5):1-6.

Wang J T, Li D F, Gong L M, et al. Effects of hyper-immune protein powder on growth performance, gut morphology and feed apparent digestibility in early weaned pigs [J]. Feed Research, 2004(5):1-6. (in Chinese)

[16] 高云英, 赵发苗, 张金良, 等. 鸡抗猪大肠杆菌高免卵黄抗体的研制和应用 [J]. 畜牧兽医杂志, 2003,22(1):5-7.

Gao Y Y, Zhao F M, Zhang J L, et al. Application and study the highly immunized yolk antibodies of escherichia coli of piglets from hen [J]. Journal of Animal Sciaence and Veterinary Medicine, 2003,22(1):5-7. (in Chinese)

(上接第 47 页)

[11] Hannon G J. RNA interference [J]. Nature, 2002,418(6894):244-251.

[12] Dzitoyeva S, Dim itrijevic N, Manev H, et al. Intra abdominal injection of double stranded RNA into anesthetized adult Drosophila triggers RNA interference in the central nervous systems [J]. Mol Psychiatry, 2001,6(6):665-670.

[13] Ramaswam S F J. siRNA: A guid for RNA silencing [J]. Chem Biol, 2002,9(10):1053-1055.

[14] Negrete A, Ling T C, Lyddiatt A, et al. Production of adenoviral vectors and its recovery [J]. Process Biochemistry, 2007,42(7):1107-1113.

[15] Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein-1c gene promoter [J]. Mol Cell Biol, 2001,21(9):2991-3000.