

鲮生长激素的重组表达及其多克隆抗体的制备

姜巨峰^{1,2}, 张殿昌^{1,2}, 苏天凤¹, 熊小飞¹, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: IPTG 诱导含有鲮 (*Cirrhinus molitorella*) 生长激素基因 (growth hormone, GH) 的工程菌 M15 (pQE30-GH) 重组表达鲮生长激素蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳结果表明, 在 24.5 kDa 处有 1 条重组表达鲮生长激素条带, 经分离纯化、复性和浓缩后得到有活性的重组鲮生长激素蛋白。以复性浓缩后的重组鲮生长激素蛋白为抗原, 采用改进的方法对新西兰大白兔进行皮下多点免疫注射, 获得兔抗鲮生长激素多克隆抗体。经 ELISA 检测该免疫血清的滴度为 12 800。以该多抗为一抗, Western blotting 可以检测到 10 ng 的抗原量; 并且在鲮垂体组织提取液中和血清中检测到一种能与该血清作用的大小约为 21.5 kDa 的蛋白条带。说明该试验所制备的兔抗鲮生长激素多克隆抗体具有较好的免疫活性。

关键词: 鲮; 生长激素; 重组表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2008)01-0036-05

Recombinant expression and antibody preparation of mud carp growth hormone

JIANG Jufeng^{1,2}, ZHANG Dianchang^{1,2}, SU Tianfeng¹, XIONG Xiaofei¹, JIANG Shigui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China)

Abstract: After inducement of IPTG, the recombinant protein of mud carp growth hormone (mcGH) was expressed in *Escherichia coli*. SDS-PAGE electrophoresis showed that there was a band of about 24.5 kDa, which size was similar to the predicted mcGH. After purification and renaturation, the recombinant mcGH was used as an antigen to inoculate the rabbit. The titer of the obtained antiserum was determined to be 1 : 12 800 by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry analysis showed that the antiserum could detect the antigen as low as 10 ng. Furthermore, western blotting analysis showed that 21.5 kDa protein in mud carp pituitary and serum could be detected using the primary antibody. These results showed that the polyclonal antiserum of rabbit anti-mcGH was effective and highly specific.

Key words: mud carp; *Cirrhinus molitorella*; growth hormone; recombinant expression; polyclonal antibody

鱼类生长激素 (growth hormone, GH) 是由脑垂体细胞合成和分泌的一种单链多肽, 其分子量在 22 kDa 左右, 可分为信号肽和成熟肽 2 个部分,

信号肽一般由 16 ~ 17 个氨基酸残基组成, 成熟蛋白由 173 ~ 190 个氨基酸组成。GH 对鱼类最明显的作用是刺激鱼体重和体长的增长, 促进发育, 参

收稿日期: 2007-09-24; 修回日期: 2007-11-05

资助项目: 广东省自然科学基金项目 (033102)

作者简介: 姜巨峰 (1981-), 男, 硕士研究生, 从事水产动物种质资源与育苗工程研究。E-mail: jufengjiang@163.com

通讯作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@21cn.com

与鱼体代谢调节, 还可以调节海河洄游性鱼类的渗透压, 并促进其对海水适应能力^[1]。GH 不但可以作为激素对鱼类的生长发育和生殖起重要作用, 而且可以作为一种细胞分裂素, 在免疫反应起作用, 同时还参与调节蛋白质, 糖和脂肪等的合成和释放, 从而影响蛋白质、糖和脂肪的代谢^[2-4]。深入研究鱼类生长激素的表达调控规律, 弄清鱼类生长发育的调控机理, 可为人工调控鱼类生长发育, 促进水产养殖业的发展提供理论依据。

鲢 (*Cirrhinus molitorella*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 中的野鲮亚科 (Labeoninae), 广泛分布于中国华南地区, 东南亚和非洲的热带及亚热带地区^[5]。鲢是中国华南地区重要的淡水养殖品种之一, 其产量占广东、广西池塘养殖鱼类总产量的 35% 左右, 具有产量高、抗病力强和肉质鲜美的特点, 其适合制作罐装食品和鱼丸, 是中国淡水鱼加工附加值最高的品种之一。但是鲢生长速度慢, 且不耐低温, 是目前制约鲢养殖产业发展的因素之一。与哺乳动物类似, 鱼类生长发育主要受 GH-IGF (胰岛素样生长因子) 的调控, 深入开展鲢生长激素表达调控机理的研究, 以便为人工控制鲢的生长发育提供理论依据。目前该试验室已克隆了鲢生长激素 cDNA 并在大肠杆菌中进行了重组表达。为进一步研究在各种条件下鲢血液和脑垂体中生长激素蛋白的表达规律, 必须要制备特异性强、灵敏度高的抗鲢生长激素抗体。因此, 该研究在重组表达了鲢生长激素蛋白的基础上, 制备了兔抗鲢生长激素多克隆抗体, 并对其灵敏度和特异性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

重组工程菌 M15 (pQE30-GH) 由笔者实验室构建, 新西兰大白兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 购于广州中医药大学实验动物中心, 鲢鱼购于广州鹭江市场, 镍琼脂糖凝胶 FF 填料购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购于 Amersham 公司, DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鲢生长激素的重组融合表达以及包涵体的

分离 取含有 500 mL LB (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp 和 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Km) 及种菌的烧瓶, 最佳诱导条件参照江世贵等^[6]对鲢生长激素 cDNA 的克隆及其重组表达产物的促生长活性的研究。在 37℃ 加入浓度为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 溶液使其终浓度 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 250 rpm 振荡培养诱导 5 h, 4℃ 保存。菌体经超声波破碎后, 4℃, 8 000 rpm 离心 20 min, 离心收集到的包涵体经 TE1 (Tris-Cl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0, EDTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), TE2 [1% TritonX-100 (V/V), Tris-Cl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0, EDTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$] 和 TE3 (尿素 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-Cl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0, EDTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 洗涤后, 即可得到初步纯化的包涵体蛋白, 然后将包涵体蛋白溶解在变性液 (尿素 8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-Cl 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ imidazole, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-mercaptoethanol) 中。

1.2.2 重组蛋白的纯化、复性和浓缩 经过包涵体分离得到的包涵体蛋白, 在 4℃, 8 000 rpm 离心 10 min 后, 上清液用 0.2 μm 的过滤器过滤, 然后上样经镍琼脂糖凝胶 FF (装填后柱床长 5 cm, 直径 1.6 cm) 亲和层析。上柱后以含 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的咪唑以及 ddH₂O 进行阶段洗脱, 流速 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 手工收集洗脱峰。将收集后的样品进行 SDS-PAGE 分析, 同时将纯化后的蛋白用稀释变性液 (尿素 8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-Cl 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 稀释到 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 装入处理好的透析袋中, 采用逐步稀释的方法复性。具体操作如下, 将装有蛋白的透析袋放到等体积的复性液 (氧化型谷胱甘肽 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 还原型谷胱甘肽 0.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-Cl 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0) 中, 4℃ 搅拌过夜, 使尿素浓度由 4 ~ 2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 再到 0.8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐步稀释, 然后在 ddH₂O (pH 8.0) 透析过夜以除去剩余的变性剂。最后, 将复性后的蛋白用超滤离心管过滤浓缩。

1.2.3 抗血清的制备 将浓缩后的重组鲢 GH 作为抗原, 采用改进的方法^[7]免疫新西兰大白兔。在第 1 天和第 3 天, 将 1 mL 样品 A (300 $\mu\text{g}\cdot 500 \mu\text{L}^{-1}$ 纯化浓缩蛋白和 500 μL Freund's 完全佐剂) 采用多点注射到兔子的背部和腿部; 第 28 天将 1 mL 样品 B (300 $\mu\text{g}\cdot 500 \mu\text{L}^{-1}$ 纯化浓缩蛋白和 500

μL Freund's 不完全佐剂) 加强免疫 1 次。第 35 天, 颈动脉取血, 37°C 放置 2 h, 4°C 过夜, 离心收集血清。

1.2.4 ELISA 分析 采用间接 ELISA 检测抗血清效价。用 $\text{pH } 9.6$, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液将纯化的重组鲮生长激素稀释为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 包被酶标板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 4°C 包被过夜。次日每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 5% 的脱脂奶粉, 37°C 封闭 1 h 后, 用 $\text{pH } 7.4$ 的 PBST 洗涤 3 次。然后每孔加入 $200 \sim 51\ 200$ 倍稀释的兔抗血清 $100 \mu\text{L}$, 阴性对照为 $1:50$ 倍稀释的免疫前血清, 空白对照为兔抗血清稀释液 (PBS), 每份样品均做 1 平行, 37°C 孵育 1 h 后, 同上洗涤 3 次。再次每孔加入 $100 \mu\text{L}$ HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 1 h 后, 同上洗涤 3 次。接下来每孔加入 $100 \mu\text{L}$ TMB 显色液, 37°C 避光反应 20 min 后, 每孔再加入 $50 \mu\text{L}$ $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸终止液。最后, 在酶标仪上测 450 nm 下的 OD 值。

1.2.5 Western blotting 分析 将抗原稀释为 0.5 、 1 、 2 、 4 和 10 ng , 经 15% SDS-PAGE 电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上。用稀释度 $1:500$ 的抗血清作为一抗^[8], 比例 $1:2\ 000$ 作为二抗稀释度, DAB 显色。标准分子量蛋白质转膜后用丽春红染色液染色。

鲮组织提取物中 GH 同源蛋白质的检测。取 100 mg 脑垂体组织加入到 $100 \mu\text{L}$ 抽提液 (4 M Urea, 0.5% W/V SDS, 10 mM EDTA 和 2 mM PMSF) 中匀浆, 94°C 孵育 10 min, $10\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min 后, 用 Bradford 方法进行定量测定^[9-10]。取鲮血 4°C , $6\ 500 \text{ rpm}$ 离心 20 min 分离血清, 同样用 Bradford 方法进行定量测定。分别取 $1 \mu\text{g}$ 脑垂体提取蛋白和 $1 \mu\text{g}$ 血清蛋白进行 Western blotting 分析。

2 结果和讨论

2.1 鲮生长激素的重组融合表达以及包涵体的分离、纯化和浓缩

如图 1 所示, IPTG 可诱导 M15 (pQE30-GH) 在大肠杆菌中大量表达。SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示, 1 条 24.5 kDa 的诱导表达重组鲮 GH 带。经过包涵体分离、纯化、浓缩得到纯度很高的蛋白。

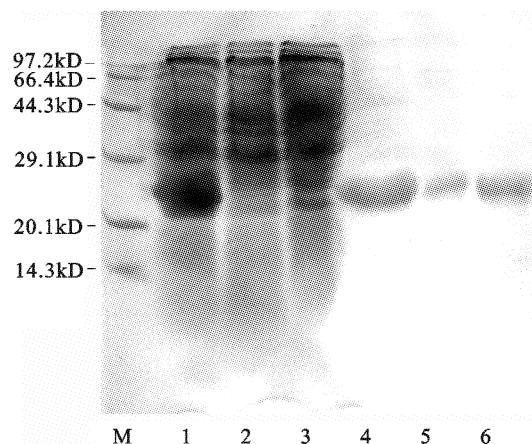


图 1 鲮生长激素的重组融合表达, 包涵体的分离, 纯化和浓缩电泳图

- M. 低分子量蛋白标准; 1. IPTG 诱导生长激素的表达;
2. 生长激素表达负对照; 3. M15 (pQE30) 诱导表达;
4. 包涵体分离后电泳图; 5. 包涵体纯化后电泳图;
6. 纯化蛋白浓缩后电泳图

Fig. 1 The electrophoresis map of the recombinant expression and purification of mud carp growth hormone

- M. low molecular weight protein marker; 1. the growth hormone induced by IPTG; 2. growth hormone expressed negative control;
3. M15 (pQE30) expressed; 4. inclusion body;
5. purified inclusion body; 6. condensed protein

2.2 ELISA 分析结果

兔抗鲮生长激素的血清进行间接 ELISA 检测时, 当(样品吸光值 - 空白吸光值)/(阴性吸光值 - 空白吸光值) > 2.1 即认为是阳性^[11], 经计算, 此研究制备的兔抗血清效价为 $1:12\ 800$ (表 1)。

2.3 Western blotting 分析结果

将抗原稀释为 0.5 、 1 、 2 、 4 和 10 ng , 经 15% PAGE 电泳分离后, 转移到硝酸纤维素膜上。用稀释度 $1:500$ 的抗血清作为一抗, 比例 $1:2\ 000$ 作为二抗稀释度, DAB 显色。标准分子量蛋白质转膜后用丽春红染色液染色。结果显示, 可检测到 10 ng 抗原量, 表明此抗体灵敏度较高 (图 2)。

为了解这一抗血清的特异性, 取鲮脑垂体组织和血清进行 Western blotting 分析。结果显示, 用此多抗可检测到 1 条大约为 21.5 kDa 的条带 (图 3), 这说明这一多抗具有较好的免疫特性。

表 1 ELISA 检测结果

Tab. 1 The results of ELISA

免疫血清稀释倍数 the antiserum dilution times	免疫血清 OD ₄₅₀ the antiserum OD ₄₅₀	阴性对照血清 OD ₄₅₀ normal rabbit serum OD ₄₅₀	空白对照 OD ₄₅₀ black control OD ₄₅₀	P/N
1 : 200	1. 186	0. 336	0. 175	+
1 : 400	1. 138	0. 336	0. 175	+
1 : 800	1. 180	0. 336	0. 175	+
1 : 1 600	1. 029	0. 336	0. 175	+
1 : 3 200	0. 872	0. 336	0. 175	+
1 : 6 400	0. 656	0. 336	0. 175	+
1 : 12 800	0. 533	0. 336	0. 175	+
1 : 25 600	0. 464	0. 336	0. 175	-
1 : 51 200	0. 379	0. 336	0. 175	-

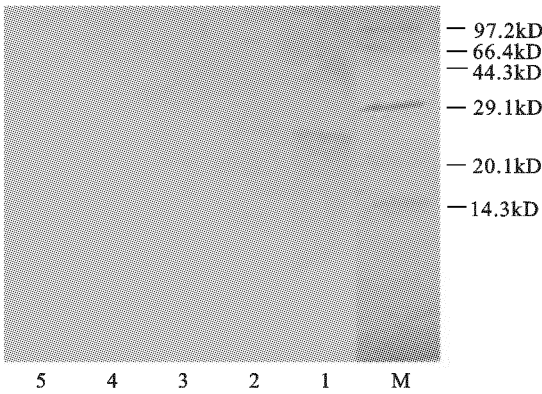


图 2 抗体灵敏度分析

M. 低分子量蛋白标准; 1. 10 ng 抗原; 2. 4 ng 抗原;
3. 2 ng 抗原; 4. 1 ng 抗原; 5. 0.5 ng 抗原

Fig. 2 The antibody sensitivety analysis

M. low molecular weight protein marker; 1. 10 ng antigen;
2. 4 ng antigen; 3. 2 ng antigen; 4. 1 ng antigen;
5. 0.5 ng antigen

此试验所表达的重组鲮生长激素主要以包涵体形式存在。另外，包涵体中的杂蛋白较少、且 50% 以上为重组蛋白，给重组蛋白的纯化带来便利。经过 3 次 TE 缓冲液洗涤，包涵体达到了较好的纯化效果，洗涤后重组蛋白纯度达到 85% 以上。初步纯化后的包涵体重组蛋白经镍琼脂糖凝胶 FF 亲和和层析后，由含 20 mmol·L⁻¹，500 mmol·L⁻¹ 的咪唑以及 ddH₂O 进行阶段洗脱，进一步纯化该重组蛋白，纯度可达到 95% 以上。由于 GH 基因内 Cys 含量较高，分子内可形成 2 个二硫键，在复性

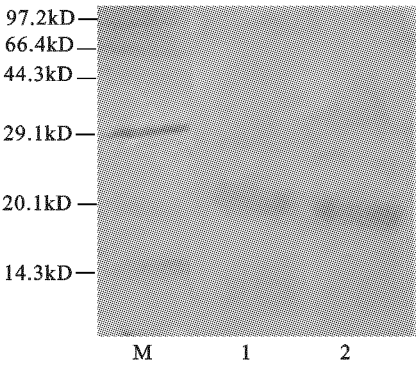


图 3 抗体特性性分析

M. 低分子量蛋白标准; 1. 血清; 2. 脑组织

Fig. 3 The antibody specificity analysis

M. low molecular weight protein marker; 1. serum; 2. pituitary

时容易形成蛋白质聚集体，所以笔者利用 GSH/GSSG 氧化交换系统促使二硫键的正确配对，同时采用稀释复性和透析复性相结合的方式对纯化蛋白进行复性。在复性过程中融合蛋白的再聚合是令人棘手的问题。姚燕等^[12] 中华绒螯蟹 (*Eriocheir japonica sinensis*) 蜕皮抑制激素基因的表达及抗体制备研究表明在可在复性液中加入甘油增加粘度来减少蛋白分子间的相互作用，从而阻止透析复性过程中蛋白的再聚合，并且 L-精氨酸作为小分子促溶剂，使整个透析过程中蛋白的聚合几率降到最低。张傅山等^[13] 研究表明在复性液中加入 10% 无水乙醇可提高复性效率。另外，蛋白质浓度也是影响蛋

白质复性的重要因素。当蛋白浓度超过 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,即使复性液中加入甘油和 L-精氨酸,复性后透析时仍会出现浑浊现象。笔者在试验中并没有加入促溶剂,直接将纯化后的蛋白用复性稀释液稀释到 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 再进行复性也得到了较好的复性效果。

经过包涵体分离的蛋白通过镍琼脂糖凝胶 FF 填料来分离带 His 标签的重组蛋白,其纯度可达 95% 以上。分离纯化的蛋白质大小为 24.5 kDa,这比 GH 成熟蛋白大了约 3 kDa 左右,这是因为 6xHis 标签的分子量约为 3 kDa,而 GH 成熟蛋白的分子量约为 22 kDa,所以该蛋白质带大小与预期大小一致。纯化的方法有很多,此试验采用的是亲和层析,该纯化方法简便,分离效果好,其纯化产物可达 95% 以上,且经过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色呈现均一的 1 条带。这说明该纯化产物可用于抗体的制备和后续的生化实验的需要。

用经改良的方法进行免疫新西兰大白兔,经过 35 d 免疫注射后,用间接 ELISA 方法检测其抗体滴度为 12 800,可以用来 Western blotting 分析。用改良后的方法来免疫新西兰大白兔在时间上由原来的 3~4 个月缩短到 35 d,大大缩短了制备高效抗血清的时间,且所制备抗血清均能用于 ELISA 和 Western blotting 分析。胡志红等^[14]用改良的方法制备了猴 (*Macaca mulatta*) Esc-615 基因多克隆抗体的制备,其抗血清滴度达到 100 000。冯浩等^[8]制备了青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 生长激素多克隆抗血清也能用于 ELISA 和 Western blotting 分析。从而表明了上述方法制备抗鲢 GH 的多克隆抗体不仅简便,而且行之有效,可为生长激素活性及功能的研究提供有效免疫学鉴定工具。

此试验制备的兔抗鲢生长激素多克隆抗体,经 ELISA 检测其滴度为 12 800,经 Western blotting 分析,可以检测到 10 ng 的抗原量,而且可以在脑垂体提取物和血清中检测到大小为 21.5 kDa 的蛋白质,充分说明该抗体具有较强的灵敏性和免疫原性,为进一步研究在不同条件下鲢血液和脑垂体中生长激素蛋白的表达规律奠定了基础。

参考文献:

- [1] RILEY L G, HIRANO T, GRAU E G. Effects of transfer from seawater to fresh water on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and prolactin in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol, 2003, 136 (4): 647-655.
- [2] JEFFERY T, SILVERSTEIN, WILLIAM R, et al. Bovine growth hormone treatment of channel catfish: strain and temperature effects on growth, plasma IGF-I levels feed intake and efficiency and body composition [J]. Aquac, 2000, 190 (1/2): 77-88.
- [3] DONALDSON E M, FAGERLUND U H, HIGGS D A, et al. Hormonal enhancement of growth [M]//Fish Physiol. New York: Academic Press, 1989: 455-459.
- [4] AGELLON L B, CHEN T T. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli* [J]. DNA, 1986, 5 (6): 463-471.
- [5] 陈湘舜, 乐佩琦, 林人端. 鲤科的科下分类及其宗系发生关系 [J]. 动物分类学报, 1984, 9 (4): 424-440.
- [6] 江世贵, 张殿昌, 苏天凤, 等. 鲢生长激素 cDNA 的克隆及其重组表达产物的促生长活性 [J]. 高技术通讯, 2004, 14 (6): 23-27.
- [7] HU Y X, GUO J Y, SHEN L, et al. Get effective polyclonal antisera in one month [J]. Cell Res, 2002, 12 (2): 157-160.
- [8] 冯浩, 成嘉, 刘妍, 等. 青鱼生长激素的重组表达及其多克隆抗体的制备 [J]. 遗传, 2005, 27 (5): 729-734.
- [9] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72 (1/2): 248-252.
- [10] DEANE E E, WOO N Y S. Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342 (4): 1 077-1 082.
- [11] 崔贞亮, 李红飞, 吴庆侠, 靳亚平, 刘璇. LH 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 西北农林学报, 2007, 16 (3): 26-28.
- [12] 姚燕, 周开亚, 宋大祥. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因的表达及抗体制备 [J]. 动物学报, 2006, 52 (1): 209-214.
- [13] 张傅山, 刘钟滨, 李荣秀. 重组人白细胞介素-17 的复性研究 [J]. 中医医刊, 2006, 33 (19): 86-88.
- [14] 胡志红, 李彬, 刘强, 等. 猴 Esc-615 基因重组蛋白质片段的表达纯化和多克隆抗体的制备 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34 (6): 753-756.