



## p53蛋白的原核表达及其鸡卵黄抗体的制备

受抗原刺激后产生免疫反应的鸡卵黄内存在一种IgG类抗体,被称为鸡卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY)。作为一种免疫试剂, IgY具有许多优点:不与蛋白A或蛋白G结合、不会激活补体系统、不与类风湿因子(RF)结合、不与哺乳动物或细菌的Fc受体结合,从而避免了免疫检测中的假阴性和假阳性问题,减少了非特异性[1][2][3][4][5]。鸡蛋来源方便,生产成本低,适于大规模生产; IgY为同一母鸡产生的抗体,均一性好;理化性质稳定,耐酸、耐热,易于保存,运输和使用均很方便。另外鸡与哺乳动物种系关系远,少量刺激时即容易产生强免疫反应,可用于一些抗原难以获得或者哺乳动物不敏感抗原的研究。基于对IgY上述特点的认识,本研究以p53蛋白作为抗原,观察了其刺激母鸡产生卵黄抗体的效果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒pGEX-4T-1由本校文宏博士惠赠; CMV-p53由第二军医大学赵健博士惠赠; 大肠杆菌BL<sub>21</sub>由本室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶BamH I、EcoR I购自New England Biolabs公司; T<sub>4</sub>DNA连接酶购自大连宝生物工程公司; GST-Sephose 4B购自Pharmacia公司; PCR产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自上海博彩生物公司; Taq DNA聚合酶、dNTP、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、弗氏佐剂、兔抗鸡IgY(辣根酶标记)抗体购自鼎国生物公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物 引物由上海生工生物工程公司合成。

上游引物: 5'-CGGATCCATGGAGGAGCCGCA GTC-3';

下游引物: 5'-GGAATTC TCAGTCTGAATCAG GCC-3';

1.1.4 序列测定 DNA序列由上海博亚生物技术有限公司测定。

1.1.5 实验动物 美国海兰白产蛋母鸡, 4月龄, 购自广州力康养鸡场。

#### 1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建 扩增p53基因从起始密码子到终止密码子的cDNA序列, 与原核表达质粒pGEX-4T-1连接后转化BL<sub>21</sub>。挑取平板上单个菌落转种肉汤, IPTG诱导后用SDS-PAGE进行鉴定, 挑选阳性者进行序列测定。

1.2.2 表达产物的纯化 大量诱导表达菌体, 离心收集菌体, 超声波破碎细胞, 经GST-Sephose 4B亲和层析分离纯化谷胱甘肽硫转移酶(GST)-p53蛋白, 用10%SDS-PAGE测蛋白纯度。

1.2.3 抗体的诱导 用纯化的融合蛋白加佐剂免疫海兰白产蛋鸡, 胸肌多点注射; 共免疫3次, 间隔14 d。第一次用弗氏完全佐剂, 50 mg/ml; 后两次采用弗氏不完全佐剂, 25 mg/ml。每次免疫前收集该鸡血清和鸡蛋。采用ELISA法测抗体效价。

1.2.4 鸡卵黄抗体的提取 卵黄按1:9加入蒸馏水稀释, 自然沉淀。取上清加入50%硫酸铵, 再用33%硫

酸铵提取，纯化的抗体经PBS透析后过滤除菌，10%SDS-PAGE测抗体纯度，分光光度计法测抗体含量。

1.2.5 Western blotting分析 诱导表达后的菌液经SDS-PAGE分离，电转移至硝酸纤维素膜上，用含0.5%Tween20的脱脂奶粉封闭，加入抗体，孵育1 h后洗涤，加入二抗孵育，洗膜后DAB显色观察结果。

1.2.6 ELISA法检测IgY 以纯化的融合蛋白包被微孔板，用1%牛血清封闭非特异性位点，洗板后加入IgY孵育，再加入酶标二抗，TMB显色观察结果。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

从转化菌中挑取单克隆，IPTG诱导，筛选有重组蛋白表达者。提取阳性克隆质粒，行双酶切，经1%琼脂糖凝胶电泳分离，发现在1 200 bp处出现酶切条带，与目的基因长度相吻合。DNA序列测定进一步证实该基因插入方向正确，位于pGEX蛋白表达框内。

### 2.2 表达产物的诱导及纯化

将含有重组质粒的克隆，以IPTG诱导表达，菌体进行10%SDS-PAGE，考马斯亮兰显色后可见在相对分子质量约80 000处出现一条蛋白浓染带。p53基因编码蛋白相对分子质量为53 000，载体质粒表达的GST蛋白的相对分子质量为26 000，共79 000；对照菌株无该条带(图1)。

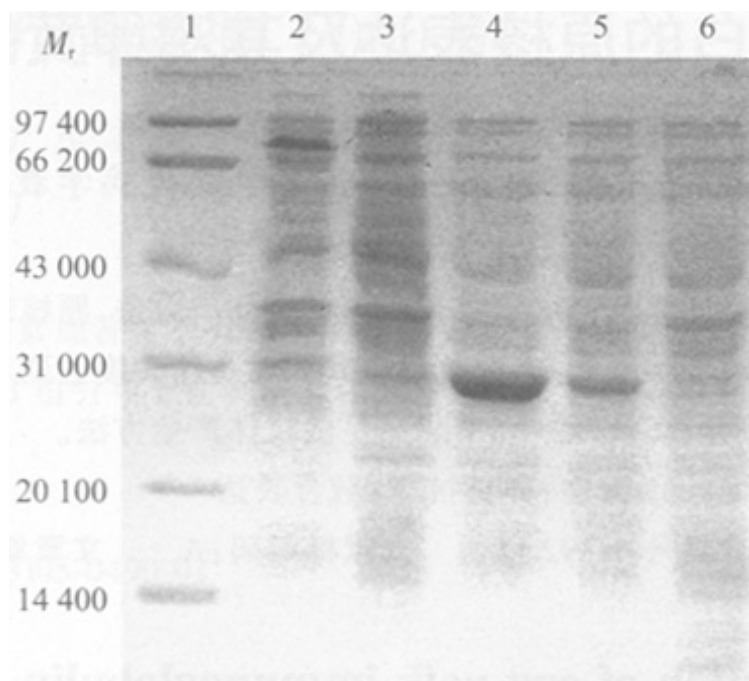


图1 SDS-PAGE分离后的蛋白条带

Fig.1 SDS-PAGE profile of proteins

Lane 1: low molecular weight marker; Lane 2: pGEX-4T-1-p53(induced); Lane 3: pGEX-4T-1-p53(uninduced); Lane 4: pGEX-4T-1(induced); Lane 5: pGEX-4T-1-p53(uninduced); 6: BL21 (induced)

### 2.3 鸡卵黄抗体的诱导

免疫前鸡卵黄及血清抗体均为阴性；首次免疫一周鸡卵黄中即产生抗体，第二次免疫后迅速上升，第4周达到高峰。鸡血清抗体效价为1：104；未提纯卵黄抗体效价为1：105；提纯后达1：106；该滴度水平至今为止已维持了3个月。

### 2.4 IgY的提取制备

抗融合蛋白抗体经硫酸铵提纯后经SDS-PAGE，结果显示IgY相对分子质量约为180 000，纯度可达90%以

上; 用分光光度计测IgY含量为20 mg/ml。

## 2.5 Western-blot杂交结果

经融合蛋白免疫后的鸡卵黄与膜上相对分子质量约80 000大小的蛋白进行了杂交, 出现一条特异显色带, 而正常鸡卵黄则未见任何条带。同时发现尽管是以融合蛋白的形式进行免疫, 但是载体本身所携带的GST蛋白却未能产生相应抗体, 在经过诱导的载体菌蛋白条带相对分子质量约26 000处未发现特异性条带(图2)。

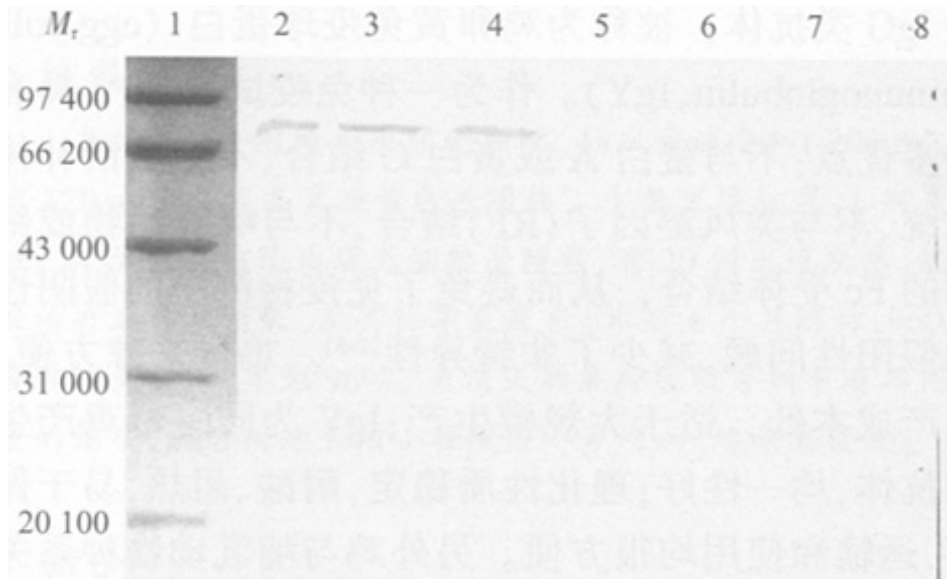


图2 融合蛋白的免疫印迹

Fig.2 Western blotting of fusion protein

Lane 1: low molecular weight marker; Lanes 2-4: pGEX-4T-1-p53(induced); Lane 5: pGEX-4T-1-p53(uninduced); Lane 6: pGEX-4T-1(induced); Lane 7: pGEX-4T-1(uninduced); Lane 8: B121

## 3 讨论

p53蛋白是抑癌基因p53的编码产物, 可通过调节其下游一系列基因的活动参与细胞内DNA损伤修复、细胞增殖和细胞凋亡等功能。

p53基因突变导致其编码产物发生变化, 产物量增加、出现畸形蛋白或功能失活蛋白。此时在正常状态下不能检测到的产物就可以通过免疫学方法检测出来, 该种变化可以判断肿瘤的增殖情况和恶性程度[6], 可作为诊断肿瘤是否发生的一种候选辅助手段。

本研究通过体外重组表达的方法获得目的p53蛋白, 结果证实该蛋白表达正确, 具有正常的生物学活性, 能与单抗以及产生的多克隆抗体发生免疫反应, 并刺激母鸡产生抗p53蛋白抗体。该抗体可用于p53蛋白的检测及有关研究。

与哺乳动物相比, 鸡与人类在种系进化上的关系较远, 因此在免疫学的研究上比哺乳动物具有更多的优势。本研究以p53蛋白作为靶抗原, 探讨鸡产生相应抗体的规律, 结果发现很少的抗原就能获得很好的免疫反应, 抗体滴度在免疫2周即开始增高, 在第4周达到最高峰, 并维持较长时间, 与国内外文献报道一致[7][8]。鸡抗体难以纯化使其应用在较长时间受到限制, 但我们的研究发现, 经一般的硫酸铵方法纯化后其纯度可达90%以上, 其关键是在进行蛋白沉淀前有效去除蛋黄中的脂类。

在研究中我们还发现, 两种不同蛋白同时作为免疫原, 有可能导致一种蛋白抑制另一种蛋白的免疫原性作用。我们的结果显示, 免疫原是由p53蛋白和GST蛋白组成的融合蛋白, 但是在进行Western-blot杂交时仅发现p53融合蛋白处出现特异条带, 不含重组质粒的诱导菌相应的GST蛋白带位置未出现特异带。该结果提示

我们以后在进行免疫刺激时应注意不同蛋白作为免疫原之间的差异。

另外, 本研究发现, 免疫前后鸡的产蛋规律和饮食、饮水均无改变, 其产蛋量、蛋的外形和重量、以及饮食习惯均与免疫前以及未免疫鸡保持一致。说明该种抗原以及所采用的免疫方法对母鸡不产生任何影响。综上所述, 卵黄抗体的生产简便、经济、特异、高效、均一、来源充足, 具有广泛的应用价值。

(责任编辑: 段咏慧)

#### 参考文献:

[1] Larsson A, Lindahl T. Chicken anti-protein G for the detection of small amounts of protein G[J]. Hybridoma. 1993, 12(1): 143-7.

[2] Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA[J]. J Immunol Methods. 1992, 156(1): 79-83.

[3] Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors[J]. Clin Chem, 1991, 37(3): 411-4.

[4] Larsson A, Mellstedt H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after in vivo treatment with murine monoclonal antibodies[J]. Hybridoma, 1992, 11(1): 33-9.

[5] Hoffman WL, Ruggles AO, Tabarya D. Chicken anti-protein A prevents Staphylococcus aureus protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results[J]. J Immunol Methods, 1996, 198(1): 67-77.

[6] 刘承勇, 漆松涛, 石丽红. 增殖细胞核抗原和p53蛋白表达与星形细胞瘤增殖调控的关系. 第一军医大学学报[J], 2001, 21(10): 758-9.

Liu CY, Qi ST, Shi LH. Relations of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein expression to the regulation of astrocytoma proliferation[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(10): 758-9.

[7] Gutierrez-Calzado E, Garcia-Garrido RM, Schade R. Human haemo- classification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens[J]. Altern Lab Anim. 2001, 29(6): 717-26.

[8] Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel-Filho FB, et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk[J]. Vet Rec, 1998 Nov 21, 143(21): 579-84.

#### 参考文献:

[1] Larsson A, Lindahl T. Chicken anti-protein G for the detection of small amounts of protein G[J]. Hybridoma. 1993, 12(1): 143-7.

[2] Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA[J]. J Immunol Methods. 1992, 156(1): 79-83.

[3] Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors[J]. Clin Chem, 1991, 37(3): 411-4.

[4] Larsson A, Mellstedt H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after in vivo treatment with murine monoclonal antibodies[J]. Hybridoma, 1992, 11(1): 33-9.

[5] Hoffman WL, Ruggles AO, Tabarya D. Chicken anti-protein A prevents Staphylococcus aureus protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and

eliminates most false positive results[J]. *J Immunol Methods*, 1996, 198(1): 67-77.

[6] 刘承勇, 漆松涛, 石丽红. 增殖细胞核抗原和p53蛋白表达与星形细胞瘤增殖调控的关系. *第一军医大学学报*[J], 2001, 21(10): 758-9.

Liu CY, Qi ST, Shi LH. Relations of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein expression to the regulation of astrocytoma proliferation[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21(10): 758-9.

[7] Gutierrez-Calzado E, Garcia-Garrido RM, Schade R. Human haemo- classification by use of specific yolk antibodies obtained after imm- unisation of chickens against human blood group antigens[J]. *Altern Lab Anim*. 2001, 29(6): 717-26.

[8] Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel-Filho FB, et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk[J]. *Vet Rec*, 1998 Nov 21, 143(21): 579-84.

---

[回结果列表](#)