

鸡 L-FABP 抗血清制备及组织表达特性分析

石 慧,王启贵,王宇祥,王 宁,李 辉*

(东北农业大学动物科学技术学院,哈尔滨 150030)

摘要: 为制备鸡肝脏型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)的多克隆抗血清,并分析 L-FABP 的组织表达特性,利用 RT-PCR 扩增 *L-FABP* 基因,构建鸡 *L-FABP* 基因的 GST 融合蛋白表达质粒 pGEX-4T/L-FABP。将重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21,IPTG 诱导产生 GST/L-FABP 融合蛋白,用亲和层析纯化目的蛋白,将纯化的 GST/L-FABP 融合蛋白免疫家兔制备抗血清,并利用此抗血清分析鸡 *L-FABP* 基因的组织表达特性。诱导得到了 1 个 40 ku(14 ku L-FABP+ 26 ku GST)的融合蛋白,获得效价较高、特异性强的鸡 L-FABP 的抗血清。鸡 L-FABP 的组织表达特性研究结果表明,该基因在肝脏和小肠组织中有较高表达,但在心脏、脂肪、肌肉、肌胃、脾、肺和肾中没有检测到表达信号。

关键词: 原核表达;抗血清;鸡;L-FABP

中图分类号:S852.5;Q786

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)11-1466-04

Preparation of Antiserums against Chicken Liver-type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) and Tissue Expression Analyses of L-FABP

SHI Hui, WANG Qi-gui, WANG Yu-xiang, WANG Ning, LI Hui*

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aim of this study was to prepare the antiserums against chicken liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) and analyze expression characteristics of L-FABP. Specific primers were designed to amplify the gene of chicken *L-FABP* by RT-PCR. The *L-FABP* gene was then inserted into pGEX4T-1 vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The protein was purified by Glutathione Sepharose 4B affinity chromatography and the antiserums against L-FABP was produced by immunizing rabbits. The tissue expression characteristics of *L-FABP* gene were determined by Western blot analysis. The results showed that a 40 ku (14 ku L-FABP + 26 ku GST) fusion protein was induced; furthermore, high titer antiserums against L-FABP was obtained. The tissue expression analysis showed that *L-FABP* was highly expressed in liver and small intestine but no hybridization signal was detected in heart, fat, muscle, muscle stomach, spleen, lung and kidney.

Key words: prokaryotic expression; antiserums; chicken; L-FABP

脂肪酸结合蛋白(Fatty acid-binding protein, FABP)是一族分子量为 14 ~16 ku 的蛋白质,广泛存在于哺乳动物的小肠、肝、心、脑和骨骼肌的细胞

内,并且含量丰富,占细胞内可溶性蛋白的 3% ~ 8%^[1]。FABPs 承担细胞内脂肪酸的运输任务,它们与脂肪酸结合并将其运输到脂肪酸氧化的位置、

收稿日期:2007-11-05

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430510);黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1152G005);国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10A120)

作者简介:石 慧(1982-),女,黑龙江双鸭山人,博士生,主要从事动物遗传育种研究,E-mail: shihuineau@gmail.com;王启贵并列为第一作者

* 通讯作者:李 辉,E-mail: lihui@neau.edu.cn

脂肪酸酯化成甘油三酯或磷脂的位置,或者进入细胞核内发挥其可能的调控功能^[2]。目前,在哺乳动物细胞内已发现 9 种胞质 FABP^[3]。在鸡肝脏细胞质中分离出 2 种 FABP,一种是非特异性脂结合蛋白,与哺乳动物肝脏来源的 FABP 不同,该蛋白对脂肪酸结合能力较弱,被命名为肝脏基础脂肪酸结合蛋白(Lb-FABP);另一种是特异性脂结合蛋白,它与大鼠的 L-FABP 结构高度相似,对脂肪酸有高度的亲和力,因此被命名为鸡 L-FABP^[4-5]。近年来对小鼠等哺乳动物 FABP 的功能研究较为深入,但对禽类 FABP 的功能研究几乎没有展开。

随着蛋白质组学时代的到来,研究某一基因的生物学功能需要从转录水平延伸到蛋白水平,而获取目的蛋白的抗血清是在蛋白质水平上研究基因功能不可缺少的部分。在前期工作的基础上,继续对鸡 L-FABP 进行研究,通过构建鸡 L-FABP 原核载体并诱导表达 L-FABP 融合蛋白,制备了高特异性的鸡 L-FABP 抗血清,进而开展鸡 L-FABP 的组织表达分析,这为阐明鸡 L-FABP 的功能奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒提取和 DNA 胶回收试剂盒购自百泰克公司;pGEX4T-1 载体为本实验室保存;Glutathione Sepharose 4B 购自 Amersham 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司;小鼠抗鸡 GAPDH IgG 购自 US Biological 公司;增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自 TIANGEN 公司;各种限制性内切酶购自大连宝生物公司。

1.2 L-FABP 的扩增

根据 GenBank 提供的 L-FABP 基因序列 (AY563636)设计引物为:LFF 5'-GAGGATCCAT-GAGCTTCACTGGAAAGTACG-3';LFR: 5'-CGCTCGAGCATGCAGGGTCTCTAGATTCTCT-3',上游引物 LFF 引入了 BamH I 酶切位点,下游引物 LFR 引入了 Xho I 酶切位点。从鸡的肝脏组织中提取总 RNA,以 Oligo(dT)₁₈ 为引物逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 °C 7 min,30 个循环(94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s),72 °C 10 min。用 DNA 胶回收试

剂盒回收 PCR 产物。

1.3 重组表达质粒的构建

BamH I/Xho I 双酶切 PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体,纯化后连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选重组表达质粒 pGEX-4T/L-FABP。重组质粒采用 BamH I/Xho I 双酶切和测序鉴定,确保构建正确的重组质粒。

1.4 L-FABP 在大肠杆菌中的表达和纯化

将重组表达质粒 pGEX-4T/L-FABP 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,37 °C 培养过夜。挑取单菌落接种于 LB 培养基,37 °C 振荡培养过夜,按 1:100 转接到大三角瓶,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 在 0.4~0.6 时加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)诱导,37 °C 继续振荡培养 6 h,7 000 r/min 离心 3 min 收集菌体。PBS 重悬后超声破碎,12 000 r/min 离心 10 min,分别取上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳。用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱对上清中的蛋白进行纯化。用 Bradford 方法测定蛋白浓度。

1.5 鸡 L-FABP 抗血清的制备

将纯化的 GST/L-FABP 融合蛋白溶于 PBS 中(浓度为 100 μ g/mL)。初免时取 1 mL 此溶液与等量的弗氏完全佐剂混合乳化,家兔背部皮下多点注射,抗原量为 100 μ g/只;每间隔 2 周取 1 mL 蛋白溶液与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫;共免疫 3 次,最后一次抗原量为 200 μ g/只。三免 1 周后心脏采血,分离血清,采用间接 ELISA 方法检测抗血清效价,-20 °C 冻存。

1.6 组织蛋白的制备

取 3 周龄肉鸡的心脏、肝脏、腹脂、肌肉、肌胃、脾、小肠、肺和肾 9 种组织,在含有 1 mmol/L PMSF 的 PBS 中匀浆,7 000 r/min 离心 15 min 取上清,-20 °C 保存。

1.7 Western blot

取每种组织蛋白 100 μ g 做 SDS-PAGE。60 V 稳压电泳至蛋白进入分离胶后,将电压调至 80 V 稳压电泳 1 h。电转移的条件是 200 mA 稳流 40 min。将本研究制备的鸡 L-FABP 抗血清以 1:3 000 稀释后用于检测鸡 L-FABP 的表达;内参为小鼠抗鸡 GAPDH IgG,稀释比例为 1:5 000。二抗分别为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG。免疫反应条件均为 37 °C 振荡孵育 1 h,用增强型 HRP-DAB

底物显色试剂盒显色。

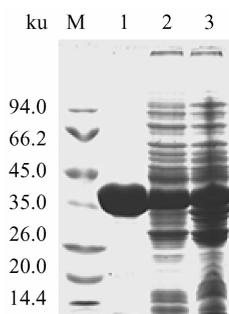
2 结果与分析

2.1 鸡 *L-FABP* 基因的获取

以鸡的肝脏组织 cDNA 为模板,利用 *L-FABP* 基因特异性引物进行 PCR 扩增,扩增片段长度为 412 bp(图略),含 *L-FABP* 的完整开放阅读框及插入载体的酶切位点。扩增片段经纯化和酶切后,与 pGEX-4T-1 载体连接构成重组质粒 pGEX-4T/*L-FABP*,重组质粒经 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切和测序鉴定,证实 *L-FABP* 基因以正确的方向插入,且与 GST 阅读框一致,能够形成 1 个 40 ku 的融合蛋白。

2.2 *L-FABP* 重组蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

将含有 *L-FABP* 基因的重组质粒 pGEX-4T/*L-FABP* 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,经 IPTG 诱导后裂解细菌,SDS-PAGE 电泳显示表达的外源性蛋白主要存在于裂解液上清中。进一步用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化所表达的融合蛋白,SDS-PAGE 电泳证实相对分子质量约为 40 ku,与预期大小相符(图 1)。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 融合蛋白 GST/*L-FABP*; 2, 3. 携带 pGEX4T-*L-FABP* 质粒的大肠杆菌的裂解物

M. Protein marker; 1. Purified recombinant GST-*L-FABP* fusion protein; 2, 3. Inclusion bodies extracted from the BL21(DE3) transformed by pGEX4T-*L-FABP* encoding *L-FABP* gene

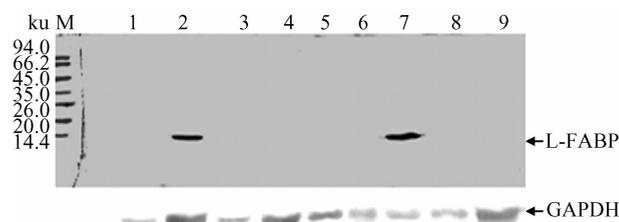
图 1 重组 *L-FABP* 蛋白的 SDS-PAGE 表达分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant *L-FABP*

2.3 鸡 *L-FABP* 基因组织表达特性分析

以鸡 *GAPDH* 为内参,采用 Western blot 分析鸡 *L-FABP* 在 9 种不同组织中的表达特性。结果显示鸡 *L-FABP* 仅在肝脏和小肠组织中有表达,并且与 *GAPDH* 相比该蛋白表达丰度较高,而在其他 7

种组织没有表达(图 2)。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 心脏; 2. 肝脏; 3. 脂肪;

4. 肌肉; 5. 肌胃; 6. 脾脏; 7. 小肠; 8. 肺; 9. 肾

M. Protein marker; 1. Heart; 2. Liver; 3. Fat; 4. Muscle; 5. Muscle stomach; 6. Spleen; 7. Small intestine; 8. Lung; 9. Kidney

图 2 鸡 *L-FABP* 组织表达特性的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of *L-FABP* in different chicken tissues

3 讨论

禽类脂类代谢及其调控与哺乳动物不尽相同而有其自身的特点。鸡的脂肪酸合成(以葡萄糖和乙酸盐为原料)仅有很少部分是在脂肪组织中进行的。虽然发现骨髓也是鸡脂质合成的一个重要场所,但肝脏被认为是鸡脂质合成的最主要场所^[6-8]。鉴于鸡脂质合成的特点,Leclercq 指出,控制鸡体脂肪组织生长主要有 3 个环节:①肝脏脂质的合成;②肝脏所合成脂质的转运;③脂肪细胞对血液中甘油三酯的吸收或清除^[9-10]。鸡 *L-FABP* 作为一种肝脏中高丰度表达的脂肪酸结合蛋白,暗示着其对肝脏脂质代谢具有一定的调控作用。因此,深入研究鸡 *L-FABP* 基因的生物学功能,对揭示禽类脂质代谢的分子机理具有重要的意义。

大量的研究表明,小鼠 *L-FABP* 在肝细胞和小肠黏膜细胞胞质中高丰度表达,它与肝脏对脂肪酸的摄取速率、长链脂酰 CoA (LCFA-CoA) 的分布、长链脂肪酸脂化成甘油三酯的数量以及小肠上皮对脂肪酸的摄取相关^[11-14]。大鼠在胚胎期 19 d 至成年,其小肠细胞内都能检测到 *L-FABP* 基因的表达^[15]。猪 *L-FABP* 在猪体组织中广泛存在,但在肝脏和小肠组织中表达量最为丰富^[16]。研究诱导得到了 GST/*L-FABP* 融合蛋白,纯化后免疫家兔获得了针对鸡 *L-FABP* 的抗血清。通过 Western blot 分析了鸡 *L-FABP* 的组织表达特性,结果表明 *L-FABP* 仅在鸡的肝脏和小肠组织中表达,并且相对于 *GAPDH* 有较高丰度的表达,这与前期利用

Northern blot 方法在 RNA 水平上的研究结果(该基因仅在肝脏和小肠组织中表达)相一致^[17],同时与其他研究人员对该基因在小鼠、大鼠和猪上的研究结果类似^[11-16],因此推测 L-FABP 在鸡肝脏和小肠组织的脂类代谢过程中发挥着重要的作用。

研究所获得的鸡 L-FABP 抗血清具有高效价(1 : 3 000)、高组织特异性的特点,有助于鸡 L-FABP 蛋白表达情况的相关研究,这为从蛋白水平上深入研究 L-FABP 的生物学功能从而揭示鸡脂代谢的分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 许宁迎,赵兴波,蒋思文. 猪鸡肉质性状分子标记及主效基因的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志,2004,40(4):42-43.
- [2] STORCH J, THUMSER A E A. The fatty acid transports function of fatty acid-binding proteins [J]. Biochim Biophys Acta,2000,1 486:28-44.
- [3] 高 妍,张永宏,李 毅,等. 脂肪酸结合蛋白研究进展[J]. 动物医学进展,2007,28(1):64-67.
- [4] SAMS G H, HARGIS B M, HARGIS P S. Identification of two lipid binding proteins from liver of Gallus domesticus [J]. Comp Biochem Physiol B,1991,99(1):213-219.
- [5] SEWELL J E, YOUNG C R, DAVIS S K, et al. Isolation and characterization of two fatty acid binding proteins from intestine of Gallus domesticus [J]. Comp Biochem Physiol B,1989,92(4):623-629.
- [6] YE H Y, LEVEILLE G A. Effect of dietary protein on hepatic lipogenesis in the growing chick [J]. Journal of Nutrition,1969,98(3):356-366.
- [7] NIR I, LIN H. The skeleton-an important site of lipogenesis in the chick [J]. Ann Nutr Metab,1982,26(2):100-105.
- [8] O'HEA E K, LEVEILLE G A. Lipogenesis in isolated adipose tissue of the domestic chick (Gallus domesticus) [J]. Comp Biochem Physiol,1968,26(1):111-120.
- [9] LECLERCQ B. The influence of dietary protein level on the growing performance of genetically lean or fat chickens [J]. Br Poult Sci,1983,24:581-587.
- [10] LECLERCQ B. Adipose tissue metabolism and its control in birds [J]. Poult Sci,1984,63:2 044-2 054.
- [11] NEWBERRY E P, XIE Y, KENNEDY S, et al. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene [J]. J Biol Chem,2003,278(51):51 664-51 672.
- [12] MARTIN G G, DANNEBERG H, KUMAR L S, et al. Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene [J]. J Biol Chem,2003,278(24):21 429-21 438.
- [13] ATSHAVES B P, MCINTOSH A L, ROSS PAYNE H, et al. Effect of branched-chain fatty acid on lipid dynamics in mice lacking liver fatty acid binding protein gene [J]. Am J Physiol Cell Physiol,2005,288:543-558.
- [14] TSO P, NAULI A, LO C M. Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. ALAN C, BRIAN H, JEREMY P. Biochemical Society Transactions [C]. UK: Organon Laboratories,2004:75-77.
- [15] 王振辉,常晓彤,付小兵,等. 翻译水平与肠道干细胞分化的关系 [J]. 中华实验外科杂志,2002,19(6):599-560.
- [16] JIANG Y Z, LI X W, YANG G X. Sequence characterization, tissue-specific expression and polymorphism of the porcine (*Sus scrofa*) liver-type fatty acid binding protein gene[J]. Acta Genetica Sinica,2006,33(7):598-606.
- [17] WANG Q, LI H, LI N, et al. Tissue expression and association with fatness traits of liver fatty acid-binding protein gene in chicken [J]. Poult Sci,2006,85(11):1 890-1 895.