

鸡 PEPT1 抗原表位基因的原核表达及序列鉴定

江 勇, 蔡辉益, 刘国华, 李 勇, 张 妹

(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘 要:根据 GenBank 的原鸡 PEPT1 基因保守区序列设计引物, PCR 扩增得到 PEPT1 基因抗原表位区序列, 将该序列定向克隆至 pET22b(+) 载体上, 成功构建了 pET-22b-PEPT1 重组质粒。重组质粒在原核表达宿主 Rosetta(DE3) 中诱导表达出 PEPT1 抗原表位区蛋白, 纯化的表达产物经过质谱分析鉴定, 为进一步生产鸡肽转运载体 PEPT1 的特异性抗体奠定了基础。

关键词:鸡; PEPT1 基因; Rosetta(DE3); 表达载体

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2008)S1-0094-05

Prokaryotic Expression and Sequence Identification of Chicken PEPT1 Epitope Gene

JANG Yong, CAIHui-yi, LIU Guo-hua, LI Yong, ZHANG Shu

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: According to the PEPT1 gene sequence in GenBank, specific primer sequences were designed to amplify the PEPT1 epitope fragment gene. The PEPT1 epitope gene was subcloned into expression vector pET-22b(+) to give pET-22b-PEPT1 and expressed in Rosetta(DE3). The expressed product was purified by Ni-NTA chromatography column and identified by SDS-PAGE, Western blot and mass spectrogram. This study was beneficial for further research on producing specific antibody for poultry intestinal PEPT1.

Key words: chicken; PEPT1 gene; Rosetta(DE3); expression vector

寡肽转运载体 PEPT1 是质子依赖型转运载体, 主要在动物的小肠表达, 是动物日粮中小肽吸收的主要途径。Addison 等最早发现动物小肠细胞中存在肽运输系统^[1]; Fei 等于 1994 年克隆了寡肽的型载体 (PEPT1)^[2]; Chen 等于 2002 年发现了家禽的寡肽载体^[3]。研究鸡的小肠肽转运载体的数量分布极其重要^[4], 现阶段研究小肠转运载体数量还仅限于从转录水平进行探讨, 而从蛋白质水平进行定量研究是研究肽载体的有效途径。

本实验利用原核表达系统表达了鸡肠道肽转运载体 PEPT1 抗原表位区段, 为进一步生产特异性抗体, 研究鸡肠道 PEPT1 蛋白分布奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

RNA 提取试剂购自德国 Qiagen 公司; 逆转录酶 SuperScript II 及 Platinum Tag 酶购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 EcoRI、XhoI 购自纽英伦生物技术有限公司; T4 连接酶, Taq 酶, dNTP 等购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司; His 抗体及金属 (Ni²⁺) 螯合琼脂糖凝胶层析柱购自 Novagen 公司; pGBM-T Easy 载体购自 Promega 公司; pET22b(+) 质粒, 大肠杆菌 Rosetta (DE3) 和 JM109 菌种均为本实验室保存。

收稿日期: 2008-03-12; 修回日期: 2008-04-30

基金项目: 国家 973 计划项目 (2004CB117500) 资助。

作者简介: 江 勇, 博士研究生, 主要从事分子营养研究。Tel: 010-62145357; E-mail: jjytl978@126.com。通讯作者: 蔡辉益, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物营养和饲料添加剂研究。Tel: 010-68975110; E-mail: caihuiyi@mail.caas.net.cn

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 按照 RNA 提取试剂的使用说明书提取鸡小肠空肠段黏膜细胞总 RNA。

1.2.2 引物合成 根据 GenBank 上 PEPT1 基因

的序列,分别设计引物扩增 PEPT1 全长编码区(CDS)序列及抗原表位区序列(AF173612),引物序列见表 1,引物由上海生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度 Length of PCR product
PEPT1 (CDS)	5'-CCGGAATTCGATGGCTGCAAAAAATAAGAG-3' (EcoRI)	2 145 bp
	5'-GCTACTCGAGCATCTGAGACAGCTTCAAG-3' (XhoI)	
PEPT1 (Antigen)	5'-GACCGAATTCGACTCTTCCAGTTTTCCTGCAAGC-3' (EcoRI)	600 bp
	5'-CGTACTCGAGCTGCCAAGCCATATGGACTG-3' (XhoI)	

1.2.3 鸡空肠段黏膜细胞总 cDNA 的合成及 PEPT1 基因的克隆 取 2 μ L 总 RNA, 1 μ L Oligo (dT), 1 μ L dNTPs, 6 μ L DEPC 处理水混合成主反应液, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 迅速放至冰浴至少 1 min; 准备第二反应混合液, 包括 10 \times RT buffer 2 μ L, 0.1 mol/L DTT 2 μ L RNaseOUT (40 U/ μ L) 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, SuperScript 1 μ L; 加入 10 μ L 的主反应混合液, 总体积为 20 μ L, 瞬时离心, 50 $^{\circ}$ C 50 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min 后, 冰浴并离心以终止反应, 加入 1 μ L RNaseH, 37 $^{\circ}$ C 处理 20 min, 所得总 cDNA 置冰浴或 -20 $^{\circ}$ C 保存。以总 cDNA 为模板, 分别用两对 PEPT1 引物进行 PCR 扩增。扩增参数为预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸时间 PEPT1 全长 CDS 为 72 2.5 min, 抗原表位区片段为 72 $^{\circ}$ C 40 s, 反应 30 个循环; 后置于 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收。按照回收试剂盒说明书进行。回收产物分别与 pGEM-T Easy 载体连接后, 进行序列测定。

1.2.4 载体构建 用限制性内切酶 EcoRI, XhoI 分别酶切 pGEM-T Easy 上的 PEPT1 基因片段及 pET22b(+) 载体, 用回收试剂盒回收目的片段及载体, 用 T4 连接酶室温连接 0.5 h, 转化到 JM109 感受态细菌中, 挑取克隆, 提取质粒, PCR 及酶切鉴定重组质粒。

1.2.5 蛋白表达及纯化 将 pET22b-PEPT1 质粒转化入 Rosetta (DE3) 感受态细菌中, 挑取单菌落, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG, 于 20 $^{\circ}$ C 过夜诱导。次日 4 $^{\circ}$ C,

12 000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 用 50 mmol/L PBS 重悬菌体, 液氮中冻融 3 次, 超声破碎菌体, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm 离心 10 min, 留上清, 0.45 μ m 滤膜过滤后, 以 Ni-NTA 纯化目的蛋白, 纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析后再用 His 抗体进行 Western 杂交分析。

1.2.6 序列分析 纯化后样品经 SDS-PAGE 后, 考马斯亮兰染色液染色, 将目的带切胶回收使用 APB000 液相色谱串联质谱 (配电喷雾离子源, Agilent 液相色谱仪), 进行质谱分析测定。

2 结果和分析

2.1 鸡 PEPT1 基因及抗原表位区序列的获得

从鸡肠道空肠黏膜细胞中提取总 RNA, 逆转录获得 cDNA, 以基因特异性引物 PCR 扩增获得大小为 2 145 bp 的全长 PEPT1 基因片段及 600 bp 的抗原表位区目的片段 (图 1)。经测序证明两片段 GenBank AF173612 序列一致, 说明已获得鸡 PEPT1 全长基因及抗原表位区序列。

2.2 重组鸡 PEPT1 抗原表位蛋白的原核表达、纯化及 Western 杂交分析

将鸡 PEPT1 基因抗原表位区序列克隆到原核表达载体 pET22b(+) 中, 转化入 Rosetta (DE3) 中进行诱导表达。SDS-PAGE 分析结果见图 2, 在预期分子质量位置约 20 kDa 处可见蛋白条带的存在。将上清可溶性表达产物经由金属 (Ni²⁺) 螯合琼脂糖凝胶层析柱纯化后进行 Western 杂交鉴定, 结果表明, 该蛋白条带可以和 His

抗体特异性结合,表明获得了纯化的重组鸡 PEPT1 抗原表位基因融合蛋白(图 3)。

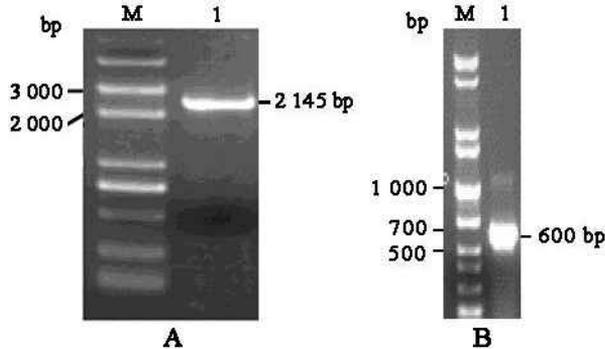


图 1 鸡 PEPT1 基因 CDS 和抗原表位区的 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of chicken PEPT1 CDS and antigen domain sequence

A: PEPT1 CDS B: PEPT1 antigen
M: DNA marker; 1: PCR 扩增片段
M: DNA marker; 1: PCR product

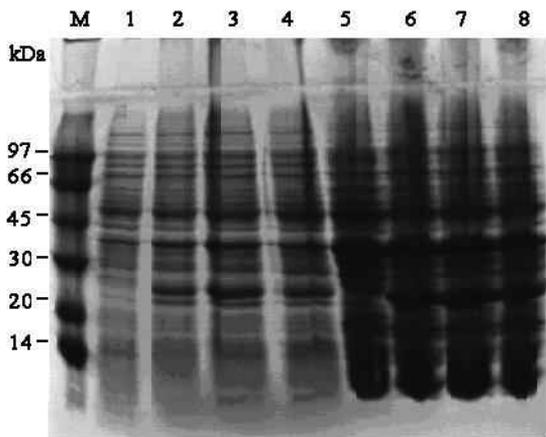


图 2 重组 PEPT1 抗原表位基因蛋白原核表达的 SDS-PAGE 分析

Fig 2 SDS-PAGE of recombinant pET22b-PEPT1 protein expressed in Rosetta (DE3).

M: 低分子量标准蛋白; 1: 未诱导上清; 2~4: 诱导上清; 5: 未诱导细胞; 6~8: 诱导细胞

M: Low molecular weight protein marker; 1: Supernatant without induction; 2~4: Supernatant after induction; 5: Cell without induction; 6~8: Cell after induction

2.3 重组鸡 PEPT1 抗原表位区蛋白的质谱检测

大多数 6 个或 6 个以上的氨基酸组成的肽序列在一个生物蛋白质组中是唯一的,因此通过将一个 6 氨基酸肽定位于单一基因产物中,就能够得到肽的序列或精确测定肽的质量,并通过蛋白质序列数据库来匹配鉴定,也称为肽质量指纹谱。

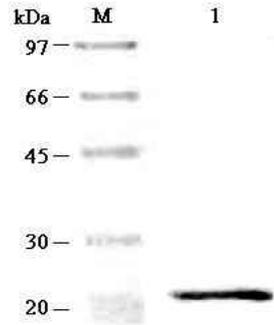


图 3 表达产物的 Western 杂交鉴定

Fig 3 Western blot of expressed product

M: 低分子量标准蛋白; 1: 纯化后的 His 融合蛋白

M: Low molecular weight protein marker; 1: Purified recombinant protein with His tag

将纯化的重组鸡 PEPT1 抗原表位区蛋白用胰蛋白酶切割,在赖氨酸和精氨酸残基位切割后产生特定长度的肽序列,这些肽段具有特定的质量,经一级质谱检测(图 4),所得肽质量与 GenBank AF173612 已发表的肽序列软件模拟酶切结果进行比对,实际酶切与理论酶切质量分析结果一致;对一级酶切产物肽片段在离子阱与中性气体原子碰撞,离子吸收动能诱导肽段的断裂,从而形成更小的肽片段,二级质谱分析(图 5)后与数据库中肽序列的理论二级质谱结果也相符合,因此基本判定所检测的蛋白为目的蛋白。

3 讨论

PEPT1 是一种原型转运载体 (prototype transporter),几乎在所有的种属中都有其成员分布,具有重要的生理功能^[5]。Hannebre 等认为,肽载体转运能力可能高于各种氨基酸载体转运能力的总和,并且在蛋白质消化过程中,以肽形式存在的氨基酸浓度远比游离氨基酸存在的浓度大,而且肽的吸收速度也快^[6,7]。实验证明鸡血液循环中具有较高的肽结合氨基酸比例,暗示了肽对鸡可能具有更为重要的意义,因此有必要就鸡对小肽的吸收和利用进行深入研究^[8]。这有助于更深层次了解鸡的肠道肽转运蛋白性质,对于调节动物肠道肽转运效率,提高动物蛋白利用率至关重要。

通过建立鸡 PEPT1 蛋白定量研究平台是研究鸡 PEPT1 转运功能及其调控的基础。目前的研究多处于转录水平的研究,而转录水平与蛋

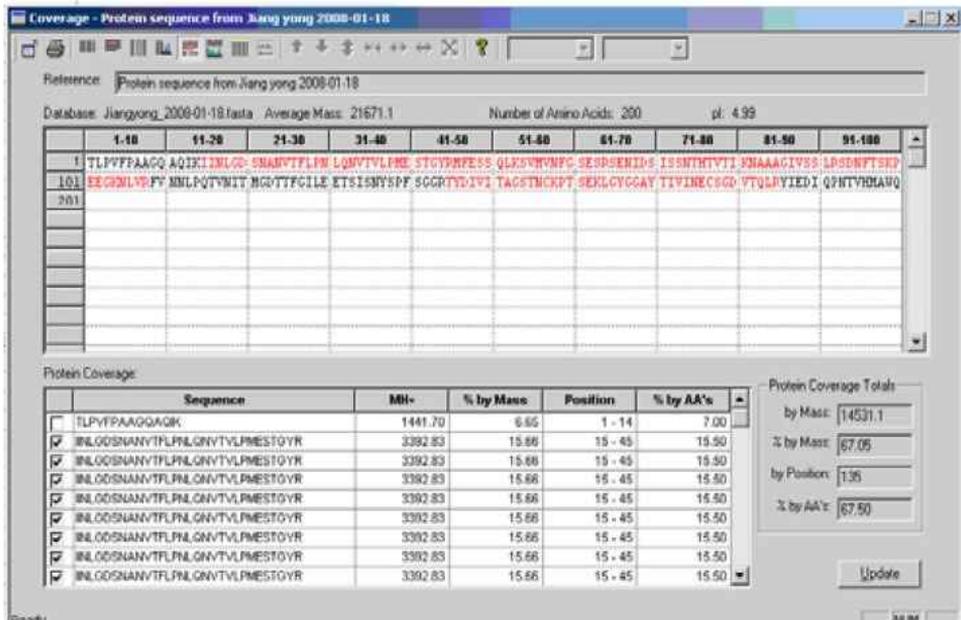


图 4 表达产物的的初级质谱鉴定

Fig 4 First step MS detection of exp re ssed product

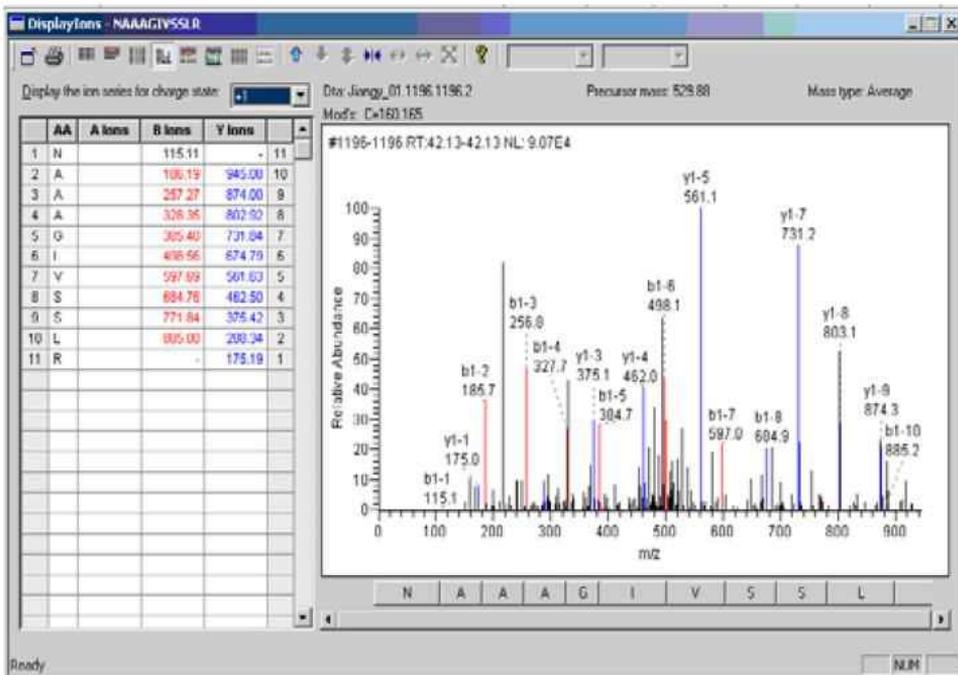


图 5 表达产物的的二级质谱鉴定

Fig 5 Second step MS detection of expressed product

白的翻译水平并无绝对的对对应关系。细胞某一蛋白质在某一特定时间的表达主要由下列因素调控：基因的转录速度； mRNA 翻译成蛋白质的效率； 细胞中蛋白质的降解速度。基因表达确

实很大程度决定蛋白质水平。然而,有些研究表明基因表达并不与蛋白水平紧密相关。这些发现也证明了 mRNA 的翻译效率和蛋白质降解速度对细胞内蛋白质表达水平的影响,同时也证明了

仅从基因水平进行分析具有局限性。蛋白质形成后,在稳定性和转换速度上与基因有很大不同。蛋白质合成后直接参与信号传导、转录因子调控和细胞周期控制,这些调控方式都说明研究某一蛋白质的表达水平比研究其基因转录水平更具有说服力。

本试验从 Chen发表的原鸡编码区 CDS序列^[3]入手,通过 BLAST比较不同动物的保守区,根据保守区设计引物,成功扩增出鸡的全长编码序列并测序正确。通过分子克隆的方法构建了鸡 PEPT1抗原表位区原核表达重组质粒 pET22b-PEPT1,并转入适合原核系统表达真核蛋白的 Rosetta(DE3)系统, IPTG诱导后在细胞及上清中成功表达了 PEPT1的抗原表位区段。通过镍亲和层析纯化目的蛋白,经 Western 杂交及串联质谱分析该目的蛋白片段,证实试验成功克隆了 PEPT1的抗原表达区段,为定量研究禽源 PEPT1,生产特异性抗体奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Addison JM, Burston D, Matthews D M. Evidence for active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro[J]. Clin Sci, 1972, 43: 907 - 911.
- [2] Fei Y J, Kana Y, Nussberger S, et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter [J]. Nature, 1994, 368: 563 - 566.
- [3] Chen H, Pan Y X, Wong E A, et al. Characterization and regulation of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) expressed in a mammalian cell line [J]. J. Nutr., 2002, 132: 38 - 42.
- [4] Meredith D, Boyd C A. Structure and function of eukaryotic peptide transporters[J]. Cell Mol Life Sci., 2000, 57: 754 - 778.
- [5] Shiraga T, Miyamoto K, Tanaka H, et al. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/peptide transporter PepT1 [J]. Gastroenterology, 1999, 116: 354 - 362.
- [6] Hannebro D. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport [J]. Annu. Rev. Physiol., 2004, 66: 361 - 384.
- [7] Hohnberg A, Kain J, Persson A, et al. Effects of digestive status on the reptilian gut [J]. Comp. Biochem. Physiol., 2002, 133(3): 499 - 518.
- [8] Chen H. Cloning, expression and developmental and dietary regulations of a chicken intestinal peptide transporter and characterization and regulation of an ovine gastrointestinal peptide transporter expressed in a mammalian cell line [D]. Blacksburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University, 2001.

【新书推介】

《畜禽健康养殖》

文 杰 主 编 中国农业科学技术出版社

出版日期： 2007. 11

I S B N: 9787802332560

定 价： 79.00元

开 本： 32开

页 数： 511页

目前,我国畜产品生产过程中存在一定的质量和安全隐患,导致肉、蛋、奶等畜产品不同程度地存在着有毒有害物质污染问题。同时动物疫病不断暴发,已成为制约我国畜牧业持续发展的“瓶颈”,并对人民群众的健康构成威胁。随着经济的发展和人民生活水平的提高,人们开始注

重生活质量,对食品的安全性和内在的品质提出了越来越高的要求。我国实施农产品安全生产和管理的时间较短,市场需求随着科技发展而不断发生变化,本书的编撰出版将有助于提高我国食品安全质量的管理水平和农产品在国内和国际市场的竞争能力。