

兔抗鸡碱性氨基酸转运载体 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体的制备及其效价和特异性分析

孙育平 甘鲁飞* 夏伟光 冯定远 左建军**

(华南农业大学动物科学学院, 广州 510642)

摘要: 为了获得兔抗鸡碱性氨基酸转运载体 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体, 并对多克隆抗体进行特异性分析, 本试验利用鸡 $b^{0,+}$ AT cDNA 全序列 (GenBank 登录号 HQ338713) 进行生物信息学分析, 预测其蛋白质理化性质、跨膜区域、二级结构及抗原表位, 并设计出 1 段抗原多肽; 构建鸡 $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$ 质粒, 原核表达融合蛋白经纯化后, 注射于新西兰大白兔, 经 3 次加强免疫后, 制备兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体, 并采用酶联免疫分析 (ELISA) 和蛋白质免疫印迹 (Western blot) 技术分析其效价和特异性。结果如下: 1) 鸡肠道 $b^{0,+}$ AT 分子质量为 53.8 ku, 等电点为 8.27, 编码 493 个氨基酸, 其中含 33 个强碱性氨基酸残基 (K、R)、28 个强酸性氨基酸残基 (D、E)、235 个疏水性氨基酸残基 (A、I、L、F、W、V)、122 个极性氨基酸残基 (N、C、Q、S、T、Y); 经推测, $b^{0,+}$ AT 有 12 个跨膜螺旋结构, 由 32.05% α -螺旋、25.96% 延伸链和 41.99% 无规则卷曲组成。2) 成功构建了鸡 $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$ 质粒并获得兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体, 抗体效价可达到 1:204 800, 且特异性较好。3) 利用制备的兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体作为一抗, 肠道组织膜蛋白为抗原, 采用 Western blot 验证获得预期的特异性条带, 一抗稀释比例为 1:4 000。结果提示, 本试验成功制备了与膜蛋白 $b^{0,+}$ AT 特异性较好的多克隆抗体, 同时其在鸡肠道组织中具有较好的应用效果。

关键词: 鸡; 碱性氨基酸转运载体; $b^{0,+}$ AT; 多克隆抗体

中图分类号: S831; S852.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)05-1025-12

动物的氨基酸营养一直以来是动物营养领域所关注的重点问题, 其中氨基酸在肠道的吸收转运及其分子机制则是近年来的研究热点。氨基酸在体内的吸收过程是由肠道刷状缘和基底膜的许多特异性转运载体跨膜转运完成的^[1]。碱性氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸, 其中赖氨酸作为家禽常规饲料中的第二限制性氨基酸而备受关注。碱性氨基酸的吸收有 4 个转运系统, 即 Na^+ 依赖性 $b^{0,+}$ 和 Na^+ 非依赖性 y^+ 、 y^+L 、 $b^{0,+}$ 系统。其中, $b^{0,+}$ 系统由重链 rBAT 和轻链 $b^{0,+}$ AT 通过二硫键的结合而成, 发挥反向交换转运的功能, 起

到向细胞内转入碱性氨基酸和胱氨酸的作用。大部分研究认为重链 rBAT 和轻链 $b^{0,+}$ AT 对于发挥 $b^{0,+}$ 系统的功能来说必不可少^[2-3], 尤其是 $b^{0,+}$ AT 甚至可以独立完成 $b^{0,+}$ 系统的功能^[4]。因此研究制备鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体对 $b^{0,+}$ AT 在肠道的基因表达、定位和生物学功能的研究具有非常重要的意义。研究表明, 肠道对碱性氨基酸的吸收主要通过 $b^{0,+}$ 系统在刷状缘转运吸收碱性氨基酸到上皮细胞, 经基底膜上的 y^+L 转运进入机体循环利用。 $b^{0,+}$ 系统是 1988 年被 Van Winkle 等^[5] 在小鼠胚泡中分离鉴定、对中性 and 碱性氨基

收稿日期: 2013-01-30

基金项目: 国家 973 资金资助 (2012CB124701)

作者简介: 孙育平 (1976—), 女, 湖南益阳人, 博士, 主要从事动物营养与生化的研究。E-mail: sunnydragon@sohu.com

* 同等贡献作者

** 通讯作者: 左建军, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zuoj@scau.edu.cn

酸有广泛底物特异性的一个 Na^+ 非依赖性二聚体,在刷状缘发挥氨基酸交换体的角色^[5]。随着人和鼠的氨基酸转运载体 cDNA 被克隆,先后有多种动物的多种氨基酸转运载体 cDNA 被克隆。目前,大鼠、兔和猪的 $\text{b}^0,+\text{AT}$ cDNA 已相继被克隆出来^[5-7]。但是,就鸡的氨基酸特别是碱性氨基酸载体而言,研究工作相对滞后,至目前鸡碱性氨基酸转运载体只有 y^+ 系统的氯霉素乙酰基转移酶 1 (CAT-1)^[8] 和氯霉素乙酰基转移酶 2 (CAT-2)^[9] 的 cDNA 全序列得到克隆,而鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 抗体的制备尚未见报道。因此,本试验首先利用鸡碱性氨基酸转运载体 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 的 cDNA 全序列进行蛋白质结构预测分析,并设计出一段抗原多肽,同时通过构建鸡原核表达载体,制备兔抗鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 多克隆抗体,并采用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 技术检测制备的多克隆抗体在鸡肠道组织的特异性,为从蛋白质水平深入探讨碱性氨基酸的吸收转运机制提供更可靠的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 7 只 7 日龄常规饲养的健康黄羽肉鸡,颈部静脉放血致死,无菌条件下采取空肠、回肠、十二指肠组织样,并制作成混合样。磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后放入 1.5 mL 离心管中,置液氮速冻后, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存。大肠杆菌 $\text{DH}_{5\alpha}$ 感受态细胞、大肠杆菌 BL21 和原核表达载体 *pET-32a(+)* 为华南农业大学动物科学学院生理生化实验室惠赠;载体 *pMD18-T* 和 *pMD18-T simple* 为日本 TaKaRa 公司产品。总 RNA 抽提试剂盒 Trizol Reagent Kit 为美国 Invitrogen 公司产品。Taq DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂 (RNasin)、DNase I、dNTPs、DNA 分子质量标准、限制性核酸内切酶等 PCR 反应试剂均购自日本 TaKaRa 公司。凝胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。M-MLV 反转录酶购自美国 Promega 公司。酶标抗体、对二甲氨基偶氮苯 (DAB) 显色试剂盒、辣根过氧化物酶 (HRP) 酶标二抗、增强化学发光 (ECL) 试剂盒及双金鸡宁酸 (BCA) 试剂盒购自广州威佳科技有限公司。蛋白胨、酵母粉、溶菌酶、考马斯亮蓝 R250、牛血清白蛋白 (BSA)、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、醋酸纤维素膜 (PVDF)、脱脂牛奶、X 光片及显影、定影浓缩

液等购自广州健阳生物科技有限公司。大肠杆菌 $\text{DH}_{5\alpha}$ 感受态细胞和弗氏 (不) 完全佐剂购自广州合达生物科技有限公司。His 标记蛋白纯化柱购自美国 Invitrogen 公司。膜蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 二级结构及抗原表位的预测分析

通过在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 上检索获得本课题组成功克隆的鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ cDNA 全序列 (Genbank 登录号 HQ338713)。采用 DNASTar 软件对鸡肠道 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 的物理化学性质进行分析;采用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 的跨膜区;采用 PREDATOR (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_preda.pl) 预测鸡肠道 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 的二级结构;采用 BepiPred 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 分析 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 的抗原表位。

1.3 多克隆抗体的制备

1.3.1 鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 基因原核表达质粒的构建

通过分析鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 的抗原表位,根据鸡 $\text{b}^0,+\text{AT}$ 基因的序列及原核表达载体 *pET-32a(+)* 多克隆位点序列,应用 Primer 5.0 软件设计 1 对引物:上游引物 [含 *Bam*H I 酶切位点和相应保护碱基 (带下划线的碱基)]: 5'-CGGGATCCGAAAGGAGGATGGACAAT-3';下游引物 [含 *Sal* I 酶切位点和相应保护碱基, (带下划线的碱基)]: 5'-GCGTTCGACATGCCAAACCAATAGAGC-3',引物由上海生工生物工程公司合成。

利用 Trizol 试剂提取鸡肠道组织总 RNA,并利用反转录试剂盒 (日本 TaKaRa) 对总 RNA 进行反转录,然后以反转录的 cDNA 为模板对目的基因进行 PCR 扩增,反应体系:PCR 缓冲液 ($10\times$, 含 Mg^{2+}) $2.0\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTP (2.5 mmol/L) $2\text{ }\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、上游和下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、Taq DNA 聚合酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,超纯水补足至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $94\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min ; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s , $53\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s , $72\text{ }^\circ\text{C}$, 40 s , 35 个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min ; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。取 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物用 DNA 凝胶提取试剂盒进行纯化回收,再与 *pMD18-T simple* 载体连接,转化到大肠杆菌 $\text{DH}_{5\alpha}$ 感受态细胞中构建重组质粒。挑取阳性克隆菌液扩大培养并用质粒小量提取试剂盒抽提质粒 $\text{b}^0,+\text{AT-pMD18-T simple}$ 。质粒 $\text{b}^0,+\text{AT-}$

pMD18-T simple 经 BamH I 和 Sal I 双酶切后获取纯化 $b^{0,+}$ AT 目的基因片段再与原核表达载体 *pET-32a(+)* 连接并转化大肠杆菌 BL21, 构建 *pET-32a(+)-b^{0,+}* AT 阳性重组表达质粒。

1.3.2 鸡 $b^{0,+}$ AT 基因的原核表达与鉴定

经测序鉴定为阳性重组表达质粒命名为 *pET-32a(+)-b^{0,+}* AT, 然后将其转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 涂在含氨苄青霉素 (Amp, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 14 h。

对照菌 [*pET-32a(+)* 转化阳性的大肠杆菌 BL21] 和重组菌 [*pET-32a(+)-b^{0,+}* AT 转化阳性的大肠杆菌 BL21] 分别挑取单菌落, 接入 3 mL 含 Amp 的 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。取 50 μL 过夜培养物接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 ~ 3 h, 至对数中期 [600 nm 吸光度值 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) = 0.6 ~ 0.8]。在培养物中加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养, 6 h 后收集诱导培养的细菌, 并设未诱导对照。各管诱导菌及未诱导菌各取 1 mL, 室温高速离心 1 min。沉淀悬于 100 μL 去离子水中, 加入 100 μL 十二烷基乙酸钠 (SDS) 上样缓冲液 (1 \times), 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 室温高速离心 1 min, 取上清样于 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中, 60 V 条件下电泳 2 ~ 5 h。

1.3.3 His- $b^{0,+}$ AT 融合蛋白的可溶性鉴定

IPTG 诱导培养 10 mL 含重组质粒 *pET-32a(+)-b^{0,+}* AT 的大肠杆菌 BL21 菌液, 诱导 4 h 后收集菌液, 12 000 r/min 离心 1 min, 加入 1 mL 结合缓冲液 (1 \times) 重悬菌体, 400 W 脉冲破碎 7 s, 间隔 9 s 冰浴超声 50 次。超声结束后于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 20 min。离心完毕, 分别收集上清及沉淀, 取上清 50 μL , 加入 50 μL SDS 上样缓冲液 (2 \times); 沉淀加入 250 μL 去离子水, 加入 250 μL SDS 上样缓冲液 (2 \times), 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 室温高速离心 1 min, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测。

1.3.4 His- $b^{0,+}$ AT 融合蛋白的大量提取与纯化

挑取含重组质粒 *pET-32a(+)-b^{0,+}* AT 的大肠杆菌 BL21 单菌落接入 5 mL 含 Amp 的 LB 培养液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。取 5 mL 过夜培养物接入 500 mL 含 Amp 的 LB 培养液, 在 2 L 摇瓶中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 ~ 3 h, 至对数中期 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ = 0.6 ~ 0.8)。于培养物加 IPTG 至终浓度为 0.05 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h, 12 000 r/min 离

心 10 min 收集菌体。每克湿重细菌用 5 mL 8 mol/L 尿素的结合缓冲液 (1 \times) 重新悬浮, 在室温条件下置摇床上温和摇动 1 h。然后将菌液用超声波 400 W, 脉冲破碎 7 s, 间隔 9 s, 冰浴超声 50 次, 取上清并用 0.45 μm 滤膜过滤。His- $b^{0,+}$ AT 融合蛋白经层析柱纯化后再进行透析, 将透析袋放入 20% 聚乙二醇溶液中进行蛋白质透析, 将纯化蛋白质浓缩至一定体积, 取出透析袋, 用蒸馏水冲洗 4 ~ 5 次后吸出浓缩的蛋白质, 再用蒸馏水冲洗透析袋内壁 2 次。以稀释的 BSA 为对照, 将浓缩后的蛋白质进行 SDS-PAGE 分析, 用核酸蛋白测定仪测定浓度, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.5 兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体的制备及鉴定

取 3 mL 透析纯化浓缩后的 His- $b^{0,+}$ AT 融合蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂进行充分乳化后免疫 3 只家兔 (抗原 1 mg/只), 于背部皮下多点注射。间隔 2 周后加强免疫 2 次 (第 2 次用弗氏完全佐剂, 第 3 次用弗氏不完全佐剂, 抗原 0.5 mg/只), 第 3 次免疫 1 周后耳静脉采血, 酶联免疫分析 (ELISA) 检测抗体效价, 若达到抗体效价要求 [阳性与阴性比值 (P/N) \geq 2.1 为阳性, 效价 \geq 1:10 000] 则心脏采血, 分离血清, ELISA 测定抗体效价, 若未达到抗体效价则继续加强免疫直至达到要求。

取免疫血清 10 mL, 加等量生理盐水稀释, 加入饱和硫酸铵溶液 20 mL, 至 50% 饱和度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h, 4 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 弃上清, 沉淀物加生理盐水 20 mL 溶解。再次加入饱和硫酸铵溶液 10 mL, 至饱和硫酸铵浓度大于 33%, 4 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 弃上清, 重复此步骤 2 次。然后将离心沉淀物加生理盐水 4 mL 溶解, 装入透析袋, 蒸馏水 4 $^{\circ}\text{C}$ 下透析 4 h, 换用生理盐水透析 48 h, 反复换液数次以去除 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 。透析后可用 40% 蔗糖浓缩溶液。

用 ELISA 检测多克隆抗体的效价。ELISA 检测板用上述的纯化好的 His- $b^{0,+}$ AT 融合蛋白抗原溶解液包被, 每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 用 100 g/L 的 BSA 封闭, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h 后, 洗涤备用。取出包被好的检测板, 每孔加入 100 μL 稀释后的待测纯化血清 (对照为正常兔血清), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 洗涤 3 次后每孔加入 1:10 000 稀释的羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG)-HRP 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 洗涤 3 次后进行四甲基联苯胺 (TMB) 显色, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 中止反应

后,测定样品检测 450nm 吸光度值($OD_{450\text{ nm}}$)。

Western blot 测定抗体特异性。取纯化好的 His- $b^{0,+}$ AT 融合蛋白 16 μL (含融合蛋白 5 μg) 加入等体积 SDS 上样缓冲液($2\times$),于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后,进行常规 SDS-PAGE,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%,220 V 电泳 45 min。以 15 V 恒压转运 1.5 h,使目的蛋白转印至 PVDF 上。用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h;然后加入 1:4 000 稀释的兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体,室温下孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜后,加入羊抗兔 IgG-HRP(1:4 000 稀释)室温下孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜后,ECL 法显色。

1.4 鸡抗 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体在肠道组织的特异性验证

鸡肠道组织中总膜蛋白的提取步骤参考凯基生物膜蛋白质提取试剂盒。蛋白质含量采用 BCA 法测定。Western blot 测定鸡抗 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗

体在肠道组织的特异性,具体操作同 1.3.5。

2 结果与分析

2.1 鸡 $b^{0,+}$ AT 的生物信息学预测分析

2.1.1 鸡 $b^{0,+}$ AT 理化性质预测分析

采用 DNASTar 软件对鸡肠道 $b^{0,+}$ AT 的物理化学性质进行分析,结果发现鸡肠道 $b^{0,+}$ AT 分子质量为 53.8 ku,等电点为 8.27,含 33 个强碱性氨基酸残基(K、R)、28 个强酸性氨基酸残基(D、E)、235 个疏水性氨基酸残基(A、I、L、F、W、V)、122 个极性氨基酸残基(N、C、Q、S、T、Y)。

2.1.2 鸡 $b^{0,+}$ AT 跨膜区预测和分析

采用 TMHMM 软件预测鸡 $b^{0,+}$ AT 的跨膜区,经过分析 $b^{0,+}$ AT 含有 12 个跨膜螺旋结构,分别位于第 36 ~ 55、72 ~ 90、115 ~ 138、155 ~ 174、187 ~ 205、222 ~ 241、259 ~ 284、311 ~ 330、355 ~ 374、383 ~ 402、415 ~ 436 和 441 ~ 460 位氨基酸(图 1)。

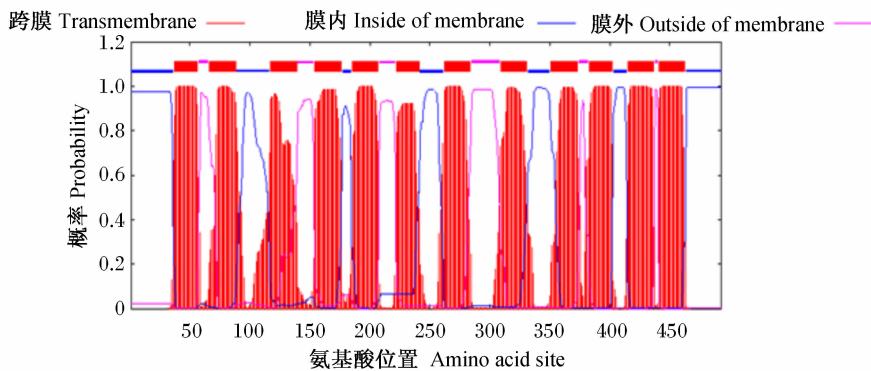


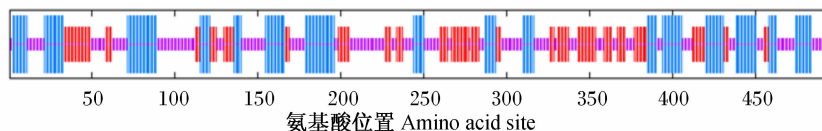
图 1 鸡 $b^{0,+}$ AT 跨膜区预测

Fig. 1 Prediction of transmembrane helices in chicken $b^{0,+}$ AT

2.1.3 鸡 $b^{0,+}$ AT 二级结构的预测和分析

二级结构主要指多肽链依赖氢键排列成在一维方向上具有周期性结构的构象,对其进行预测与分析有助于认识蛋白质的空间结构。采用

PREDATOR 在线预测鸡肠道 $b^{0,+}$ AT 的二级结构,结果发现鸡肠道 $b^{0,+}$ AT 由 32.05% α -螺旋、25.96% 延伸链和 41.99% 无规则卷曲组成,其中无规则卷曲占主要部分(图 2)。



长竖线表示 α -螺旋,中竖线表示延伸链,短竖线表示无规则卷曲。

Long vertical line indicates α -helix, medium vertical line indicates extending chain, and short vertical line indicates random coil.

图 2 鸡 $b^{0,+}$ AT 二级结构预测

Fig. 2 Prediction of secondary structure of chicken $b^{0,+}$ AT

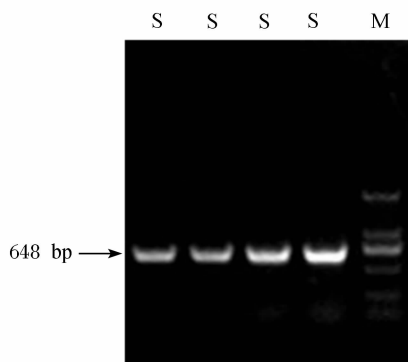
2.2 鸡 $b^{0,+}$ AT 的原核表达

2.2.1 鸡 $b^{0,+}$ AT 胞外区部分抗原表位基因的扩增

以鸡肠道 $b^{0,+}$ AT cDNA 为模板,用加酶切位点的特异性引物进行 PCR 扩增,得到 $b^{0,+}$ AT 胞外区部分抗原表位基因片段,约为 648 bp,与预期片段大小一致(图 3)。

2.2.2 原核表达质粒 $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple* 的双酶切

将纯化的 PCR 产物与 *pMD18-T simple* 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,进行 PCR 鉴定。将阳性克隆菌液扩大培养,抽提 $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple* 质粒后用 BamH I 和 Sal I 进行双酶切(图 4)。结果表明,条带大小正确且酶切效果好。

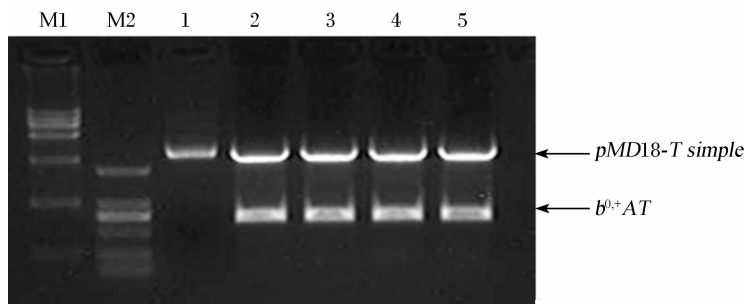


M: DNA 分子质量标准, S: PCR 产物。

M: DNA molecular weight marker, S: PCR product.

图 3 鸡 $b^{0,+}$ AT 部分抗原表位基因 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electrophoretogram of the PCR product from part of chicken $b^{0,+}$ AT antigen epitope gene



M1、M2: DNA 分子质量标准, 1: *pMD18-T simple*, 2~5: BamH I 和 Sal I 酶切后的 $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple*。

M1 and M2: DNA molecular weight marker, lane 1: *pMD18-T simple*, lanes 2 to 5: products of $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple* digested by BamH I and Sal I.

图 4 $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple* 质粒的双酶切图

Fig. 4 Double enzyme digestion map of $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple* plasmid

2.2.3 重组表达载体 *pET-32a(+)* 的双酶切

以 *pET-32a(+)* 表达菌培养于若干支 4 mL LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜,用质粒小量抽提试剂盒抽提质粒,用 BamH I 和 Sal I 进行双酶切(图 5)。结果表明,条带大小正确且酶切效果好。

2.2.4 鸡 $b^{0,+}$ AT 基因片段与 *pET-32a(+)* 的重组表达

用 BamH I 和 Sal I 对 $b^{0,+}$ AT-*pMD18-T simple* 和 *pET-32a(+)* 进行酶切回收后,在 16 °C 条件下连接过夜,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,37 °C 培养过夜。取菌液为模板,用 $b^{0,+}$ AT 特异性引物进行 PCR 菌液鉴定,1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 6。选择 PCR 结果为阳性的重组菌培养于 4 mL

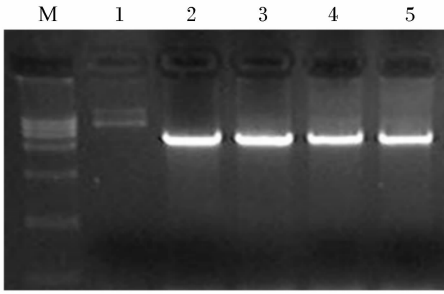
LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜,用质粒小量抽提试剂盒抽提质粒,重组质粒命名为 *pET-32a(+)-b^{0,+} AT*。选取阳性克隆的 *pET-32a(+)-b^{0,+} AT* 送上海英骏生物技术有限公司进行测序,经 DNAMAN 软件比对,结果表明与试验所克隆基因的相似性为 100%,表明构建的载体正确,可用于融合蛋白的诱导表达。

2.3 $b^{0,+}$ AT 蛋白原核表达及其纯化

2.3.1 *pET-32a(+)-b^{0,+} AT* 诱导表达后 SDS-PAGE 结果

将重组质粒 *pET-32a(+)-b^{0,+} AT* 转化大肠杆菌 BL21,经 IPTG 诱导后,获得高效表达,SDS-PAGE 结果显示,在目的蛋白的泳道处出现约 25 ku 的条带,而对照均无该条带,条带大小与预测

相差 10 ku 左右(图 7)。



M: DNA 分子质量标准, 1: *pET-32a(+)*, 2~5: BamH I 和 Sal I 酶切后的 *pET-32a(+)* 产物。

M: DNA molecular weight marker, lane 1: *pET-32a(+)*, lanes 2 to 5: products of *pET-32a(+)* digested by BamH I and Sal I.

图 5 *pET-32a(+)* 载体的双酶切图

Fig. 5 Double enzyme digestion map of *pET-32a(+)* vector

2.3.2 表达产物的可溶性分析

将 *pET-32a(+)-b⁰⁺AT* 进行诱导表达后, 收集菌体进行超声破碎, 离心后分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。结果表明, 该表达产物在包

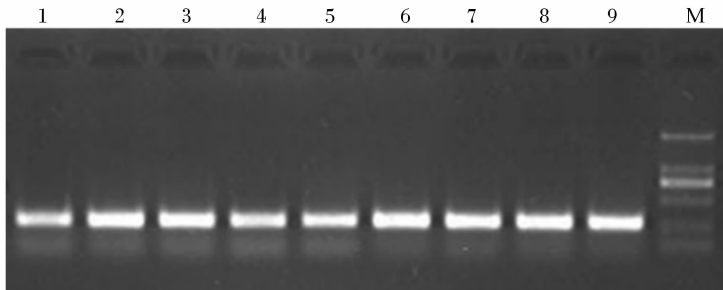
涵体中含量极低, 目的蛋白主要以可溶性上清的形式存在(图 8)。

2.3.3 融合蛋白纯化条件的优化

基于 *pET-32a(+)* 系统的表达产物有 6 个组氨酸标签, 因此选择 Ni 柱进行纯化, 结果见图 9。结果表明, 10 和 20 mmol/L 的咪唑浓度的洗脱液不能有效地把目的蛋白洗脱下来, 但可以去除细菌杂蛋白, 当经过 20 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱后, 再用 30 mmol/L 咪唑时, 可以有效地把目的蛋白洗脱, 而用 40 mmol/L 咪唑的洗脱液时, 只有很少残余的目的蛋白被洗脱下来, 故本试验采用 20 mmol/L 咪唑的洗脱液漂洗后再用 30 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱细菌蛋白, 从而达到纯化目的蛋白的目的。

2.3.4 融合蛋白纯化、透析及浓缩后电泳检测

将经过纯化和透析的蛋白质进行 SDS-PAGE 分析, 可见 1 条清晰的条带(图 10), 其分子质量约为 25 ku, 纯度约为 76.8%, 说明该融合蛋白已经得到了较好的纯化和浓缩。与 BSA 进行对比, 并用核酸蛋白测定仪确定目的融合蛋白的浓度。



M: DNA 分子质量标准, 1~9: *pET-32a(+)-b⁰⁺AT*。

M: DNA molecular weight marker, lanes 1 to 9: *pET-32a(+)-b⁰⁺AT*。

图 6 重组菌液 PCR 鉴定结果

Fig. 6 PCR testing result of recombinant bacteria liquid

2.4 多克隆抗体制备

2.4.1 多克隆抗体效价的测定

初次免疫后加强了 3 次免疫, 经 ELISA 检测效价达到要求后, 心脏采血, 得到的抗血清用饱和硫酸铵分 3 次沉淀免疫球蛋白, 纯化后的血清进行 ELISA 检测血清效价 ($P/N \geq 2.1$ 时为阳性)。3 次加强免疫后抗血清抗体效价都可达 1:204 800 (图 11)。

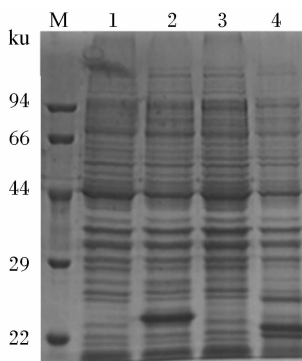
2.4.2 多克隆抗体的特异性检测

以 *b⁰⁺AT* 重组蛋白作为抗原进行 Western blot 检测, 通过 DAB 法显色, 可以在 25 ku 附近看到明显的条带。而以 *pET-32a(+)* 空载体蛋白为抗原进行 Western blot 检测, 则没有任何条带(图 12)。结果表明, 制备的 *b⁰⁺AT* 多克隆抗体特异性较好。

2.5 多克隆抗体在肠道组织的特异性验证

为了进一步验证所制备的多克隆抗体的特异

性,提取了目的融合蛋白高表达的肠道组织中的总膜蛋白,以总膜蛋白作为抗原进行 Western blot 检测,通过 ECL 曝光法,可以在 50 ku 附近看到明显的条带,且没有杂带(图 13)。结果表明,制备的 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体与鸡肠道组织中 $b^{0,+}$ AT 有很好的亲和力,且特异性较好。

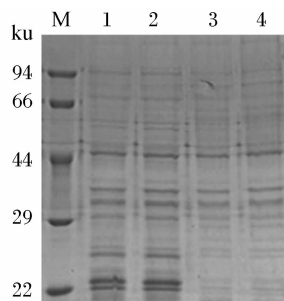


M: 蛋白质分子质量标准, 1: pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT 未加 IPTG 诱导表达产物, 2: pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT 加 IPTG 诱导表达产物, 3: pET-32a(+) 诱导表达产物未加 IPTG, 4: pET-32a(+) 加 IPTG 诱导表达产物。

M: protein molecular weight marker, lane 1: expression product of pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT, lane 2: induced expression product of pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT with IPTG, lane 3: expression product of pET-32a(+), lane 4: induced expression product of pET-32a(+) with IPTG.

图 7 重组菌诱导表达产物分析

Fig. 7 Induced product of recombinant bacteria

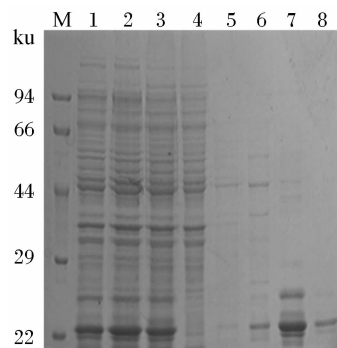


M: 蛋白质分子质量标准, 1~2: 裂解菌体离心上清, 3~4: 裂解菌体沉淀。

M: protein molecular weight marker, lanes 1 to 2: supernatant of bacterial lysates, lanes 3 to 4: precipitation of bacterial lysate.

图 8 目的蛋白的可溶性分析

Fig. 8 Solubility analysis of object protein

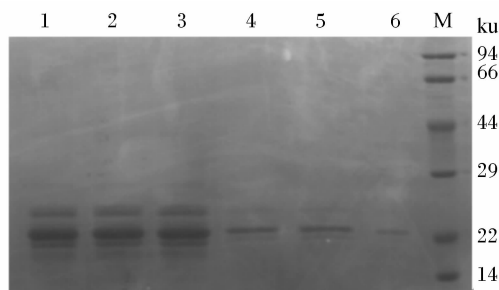


M: 蛋白质分子质量标准, 1, 2: 诱导表达菌液, 3: 裂解菌体离心上清, 4: 裂解菌体沉淀, 5: 10 mmol/L 咪唑洗脱液, 6: 20 mmol/L 咪唑洗脱液, 7: 30 mmol/L 咪唑洗脱液, 8: 40 mmol/L 咪唑洗脱液。

M: protein molecular weight marker, lanes 1 and 2: induced bacteria liquid, lane 3: supernatant of bacterial lysates, lane 4: precipitation of bacterial lysate, lane 5: 10 mmol/L eluent of imidazole, lane 6: 20 mmol/L eluent of imidazole, lane 7: 30 mmol/L eluent of imidazole, lane 8: 40 mmol/L eluent of imidazole.

图 9 目的蛋白纯化条件优化

Fig. 9 Optimization of purification conditions for object protein



M: 蛋白质分子质量标准, 1~6: pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT 融合蛋白浓缩样。

M: protein molecular weight marker, lanes 1 to 6: concentrated fusion protein of pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT.

图 10 融合蛋白纯化、透析及浓缩后电泳检测

Fig. 10 Electrophoretogram of fusion protein processed by purification, dialysis and concentration

3 讨论

3.1 pET-32a(+) - $b^{0,+}$ AT 的原核表达和多克隆抗体的制备

本试验通过对 $b^{0,+}$ AT 基因进行了扩增与克隆, 连接到 pET-32a(+) 载体上, 构建了可高效表

达目标蛋白的重组质粒 $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$ 。用已确定的最佳诱导条件,实现了对大肠杆菌 BL21 中 $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$ 重组融合蛋白的高效表

达和纯化,为下一步制备免疫原,进行动物免疫试验奠定了基础。

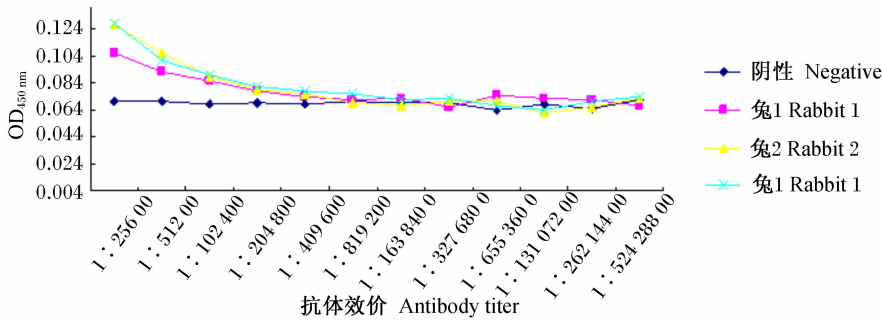
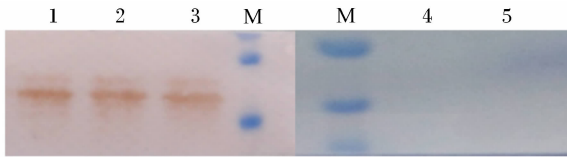


图 11 $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$ 融合蛋白免疫兔后抗血清效价

Fig. 11 The titre of rabbit antiserum against fusion protein of $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$



M: 蛋白质分子质量标准, 1~3: $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$ 融合蛋白, 4~5: $pET-32a(+)$ 。

M: protein molecular weight marker, lanes 1 to 3: fusion protein of $pET-32a(+)-b^{0,+}AT$, lanes 4 to 5: $pET-32a(+)$ 。

图 12 多克隆抗体的特异性检测

Fig. 12 Specific detection of polyclonal antibody

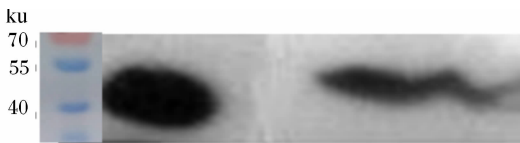


图 13 以组织膜蛋白为抗原的 Western blot 分析

Fig. 13 Western blot analysis of the antigen of tissue membrane protein

抗原和抗体是免疫学检验的两大重要因素,也是整个免疫反应的基本条件。特异性抗体是免疫应答中的重要产物,也是免疫学试验中常用的试剂,对于抗原的分析鉴定和定量检测极为重要,在各种免疫学诊断中应用极为广泛。目前人工制备的特异性抗体分多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体 3 种类型。单克隆抗体用杂交瘤技术制备,多克隆抗体存在于免疫动物抗血清中^[10-11],前者生产成本低、周期长,试验技术要求

高,故本研究选择制备多克隆抗体。

本试验利用融合蛋白与弗氏(不)完全佐剂混合对新西兰兔进行免疫,并制备获得高效价的抗血清。在多克隆抗体制备中以弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂最为常用。通常佐剂与抗原等量混合,充分乳化。弗氏不完全佐剂不含卡介苗,其他同弗氏完全佐剂^[12]。免疫原合适剂量的选择应考虑抗原性强弱、分子质量大小、动物大小和免疫时间,本研究使用的重组蛋白的免疫剂量为基础免疫 1 mg/只,加强免疫每次为 0.5 mg/只。

免疫注射的途径也很重要,根据抗体产生的时间规律,一般在初次接触抗原后的 7~10 d,动物血清才有抗体产生,并在 14~21 d 内达到高峰,称初次免疫。此后一定时间内,如再次接触同一抗原,则特异性抗体的生成量将会超过初次反应的许多倍,称再次免疫。本试验采用初次免疫 15 d 后进行再次免疫,加强免疫 3 次,每次间隔时间也为 15 d,最后一次加强免疫采用直接耳缘静脉注射,且不加任何辅助佐剂,制备出抗 $b^{0,+}AT$ 多克隆抗体。在每次免疫前采血 2 mL,最后一次采用颈动脉放血,分离血清时要避免溶血,以免影响抗血清效价的测定。

蛋白质抗原免疫动物制备的抗血清中,主要的特异性抗体是 IgG,抗血清的纯化即从血清中分离 IgG,本试验采用饱和硫酸铵盐析的方法分离纯化 IgG。由于不同蛋白质析出时所要求盐类浓度不同,因此可利用不同浓度的盐溶液,使各个蛋白质成分分别析出,以达到分离提纯的目的。血清

球蛋白在硫酸铵饱和度为 33% ~ 50% 时能较好地析出沉淀,而白蛋白不易沉淀,从而达到分离纯化的目的。因此,选择 50% 和 33% 饱和硫酸铵分 2 次沉淀免疫球蛋白,可获得较纯的免疫球蛋白。

对所获得的抗血清纯化后进行间接 ELISA 检测发现,3 只新西兰兔产生的抗血清效价基本相同,且效价相当高,均达到 1:204 800。Western blot 检测表明,所制备的抗 $b^{0,+}AT$ 多克隆抗体具有较强的反应特异性,能够与表达的重组蛋白发生特异性反应。

3.2 兔抗 $b^{0,+}AT$ 多克隆抗体的特异性验证及应用

Western blot 技术是用来检测蛋白质表达比较灵敏的方法,由蛋白质 SDS-PAGE、转膜、膜封闭,靶蛋白与第一抗体的反应,结合靶蛋白的一抗和二抗的反应,显色等组成。其原理是将凝胶上的蛋白质转移到膜上,用其他蛋白质作为封闭液,加入与检测蛋白质特异性的第一抗体及酶标二抗,经免疫反应,一抗和二抗与靶蛋白结合,通过酶标反应,在显色液中,膜上结合靶蛋白、一抗和二抗的位置呈现一定的颜色,或者产生荧光。目前特异性一抗主要有单克隆抗体和多克隆抗体,但各有优缺点。

单克隆抗体是通过识别单个抗原表位达到分析目的,表现出很好的特异性。但如果所识别的抗原表位被破坏,则会影响试验结果,反应强度不如多克隆抗体^[13]。另外,由于单克隆抗体不能进行沉淀和凝集反应,所以很多检测方法不能用单克隆抗体完成,从而限制了它的应用范围^[14]。而多克隆抗体虽然存在交叉反应的问题,但由于识别多个抗原表位,所以即使有少数几个抗原表位被破坏,仍然不会影响试验结果,表现出很好的反应强度,这就是其优点^[15]。同时,目前单克隆抗体种类尤其是畜禽的并不多,且制备技术复杂,费时费工,多需从国外进口,价格十分昂贵,所以多克隆抗体在畜禽的应用仍具有一定优势^[13,16]。

虽然关于多克隆抗体的应用的研究报道不是很多,尤其是畜禽应用方面,但在国外较早就有相关的报道,Ruff 等^[17]通过注射 1 种小肽到新西兰大白兔,纯化后获得多克隆抗体,用制备的多克隆抗体成功检测到该基因在小鼠各组织部位的表达,且有很好的特异性。Paglini 等^[18]分别用单克隆抗体和多克隆抗体作为一抗分析 10 胎龄鸡胚

皮春纳病毒细胞受体时,Western blot 和免疫荧光检测结果都显示多抗和单抗出现相同的试验结果。在肉鸡试验中,制备了抗鸡肌肉生长抑制素(myostatin)基因多克隆抗体,Western blot 分析该抗体对鸡骨骼肌 myostatin 前肽表现出很高的亲和力和^[19-20]。

国内也有相关的研究报道。王弘珺等^[21]通过克隆小鼠叉头蛋白 P3(*Foxp3*)基因片段,采用基因重组方法构建重组表达载体,在大肠杆菌中诱导产生融合蛋白质免疫家兔后,获得兔抗 *Foxp3* 多克隆抗体,采用 Western blot 分析,转染了 *Foxp3* 基因的 *Migr* 载体的细胞蛋白质中表现有特异性蛋白质条带,而转染 *Migr* 空载体的细胞中没有目的条带,证明制备多克隆抗体的特异较好。姜飞等^[22]利用纯化后的三结构域蛋白 59(*Trim59*)多克隆抗体进行 Western blot 检测分析在小鼠成纤维细胞中对 *Trim59* 蛋白的特异性及其表达,结果在预期位置获得了单一蛋白质条带,表明制备的 *Trim59* 多克隆抗体特异性良好,也进一步说明了制备获得的多克隆抗体可特异性识别目的蛋白质。万里川等^[23]采用制备的膜糖蛋白-1(*PC-1*)多克隆抗体进行 Western blot 分析,结果表明可以检测到昆明小白鼠结肠中存在目的蛋白质,在肾脏中量少,而在心脏、肺、肝脏、胃、脾脏未检测出,这也为进一步研究目的蛋白质的功能提供了良好的检测用抗体。李明堂等^[24]应用 Western blot 技术分析获得了特异性较强的多克隆抗体,同时发现目的蛋白质在心肌细胞、脾索和脾被膜的单层上皮细胞、肺成纤维细胞中均能少量检出。孔卫青等^[25]采用 Western blot 鉴定抗体特异性,同时用免疫荧光染色鉴定抗体特异性并观察 DNA 裂解因子 45(*DFF-45*)的细胞定位,进一步检测 *DFF-45* 在人类几种细胞系的表达差异情况,结果显示,制备的多克隆抗体不与将谷胱甘肽 S 转移酶(*GST*)相互作用,表明该抗体经纯化后,其中几乎不含抗 *GST* 成分,从而排除了 *GST* 抗体非特异性干扰结果的可能性。进一步检测发现,该抗体可与原核表达的 *DFF-45* 融合蛋白特异性结合,并且可与真核细胞中内源性与外源性的 *DFF-45* 蛋白特异性结合,表明制备的抗体具有高度特异性和很好的应用价值。

在本试验中,通过构建鸡 *pET-32a(+)-b^{0,+}AT* 载体,原核表达蛋白纯化后注射新西兰大白兔,

加强免疫后获得了兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体,制备的多克隆抗体不与空载体 His 蛋白发生结合,表明该抗体经纯化后,其中基本不含抗 His 成分,从而排除了 His 抗体非特异性干扰结果的可能性。进一步检测发现,该抗体可与重组的 $b^{0,+}$ AT 融合蛋白特异性结合,表明制备的抗体具有高度特异性。而制备一种效价高、特异性好的抗体,是研究相关基因的表达、定位和生物学功能非常重要的一步。为了进一步验证制备的多克隆抗体的特异性,本试验也运用 Western blot 技术分析其多克隆抗体在鸡肠道粘膜组织中对膜蛋白 $b^{0,+}$ AT 的特异性验证,结果显示在分子质量 50 ku 处出现了预期的特异性条带。结果提示,本试验制备了与膜蛋白 $b^{0,+}$ AT 特异性较好的多克隆抗体。除本试验之外,有关氨基酸转运载体抗体制备的研究至今报道很少,仅见 Ohno 等^[26]和 Shiraishi 等^[27]分别报道过 L 型氨基酸转运蛋白 1 (LAT-1) 和中性氨基酸转运蛋白 2 (ASCT2) 的单克隆抗体制备,且均为医学诊断为目的。所以,本试验成功制备鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体、并在机体肠道组织中得到验证和开展了初步应用研究,为下一步在活体组织 $b^{0,+}$ AT 蛋白质水平上研究以探讨动物氨基酸营养吸收的分子机制打下了坚实的基础。

4 结 论

① 鸡肠道 $b^{0,+}$ AT 分子质量为 53.8 ku,等电点为 8.27,编码 493 个氨基酸,其中含 33 个强碱性氨基酸残基 (K、R)、28 个强酸性氨基酸残基 (D、E)、235 个疏水性氨基酸残基 (A、I、L、F、W、V)、122 个极性氨基酸残基 (N、C、Q、S、T、Y),经推测 $b^{0,+}$ AT 蛋白有 12 个跨膜螺旋结构,由 32.05% α -螺旋、25.96% 延伸链和 41.99% 无规则卷曲组成。

② 成功构建了鸡 *pET-32a(+)-b^{0,+}AT* 质粒并获得兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体,抗体效价可达到 1:204 800,且特异性较好。

③ 利用制备的兔抗鸡 $b^{0,+}$ AT 多克隆抗体作为一抗,肠道组织膜蛋白为抗原,采用 Western blot 验证获得预期的特异性条带,一抗稀释比例为 1:4 000。

参考文献:

- [1] SILK D, GRIMBLE G, REES R. Protein digestion and amino acid and peptide absorption [J]. Proceedings of the Nutrition Society, 1985, 44 (1) : 63 - 72.
- [2] SUGAWARA M, NAKANISHI T, FET Y J, et al. Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue expression pattern identical to that of system A [J]. Biological Chemistry, 2000, 275 (22) : 16473 - 16477.
- [3] 职爱民. 猪肠道碱性氨基酸转运载体 cDNA 的克隆及其 mRNA 的表达与体外调控 [D]. 博士学位论文. 广州: 华南农业大学, 2008: 117 - 129.
- [4] REIG N, CHILLARON J, BARTOCCIONI P, et al. The light subunit of system $b^{0,+}$ is fully functional in the absence of the heavy subunit [J]. The EMBO Journal, 2002, 21 : 4906 - 4914.
- [5] VAN WINKLE L, CAMPIONE A, GORMAN J. Na^{+} -independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 (7) : 3150 - 3163.
- [6] CHAIROUNGDU A, SEGAWA H, KIM J Y, et al. Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein [J]. Biological Chemistry, 1999, 274 (41) : 28845 - 28848.
- [7] RAJAN D P, KEKUDA R, HUANG W, et al. Cloning and expression of a $b^{0,+}$ -like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT [J]. Biological Chemistry, 1999, 274 (41) : 29005 - 29010.
- [8] LAING E, MATTHIAS D, HUMPHREY B D. Molecular cloning of chicken cationic amino acid transporter-1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107 (45) : 19496 - 19501.
- [9] HUMPHREY B D, KIRSCH S, MORRIS D. Molecular cloning and characterization of the chicken cationic amino acid transporter-2 gene [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150 (3) : 301 - 311.
- [10] MENOTTI L, CERRETANI A, CAMPADELLI-FIUME G. A herpes simplex virus recombinant that exhibits a single-chain antibody to HER2/neu enters cells through the mammary tumor receptor, independently of the gD receptors [J]. Journal of Virology, 2006, 80 (4) : 5531 - 5539.
- [11] MAKONKAWKEYOON L, PHAREPHAN S, MAKONKAWKEYOON S. Production of a mouse hybrid-

- doma secreting monoclonal antibody highly specific to Hemoglobin Bart's ($\gamma 4$) [J]. *Laboratory Hematology*, 2006, 12(4): 193 - 200.
- [12] 柳忠辉, 吕昌龙. 免疫学常用实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] FUKASAWA T, YAMAGUCHI Y, SAITO H. Establishment of anti-idiotypa monoclonal antibodies for specific and active immunotherapy in lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 1995, 12: 127 - 137.
- [14] 尹红章, 李秀华, 王兵, 等. 应用鸡卵细胞大量制备多克隆抗体[J]. *中国生物制品学杂志*, 1993, 6(4): 167 - 169.
- [15] 董国伟, 王沫, 刘贤进, 等. 兔抗甲胺磷多克隆抗体的制备[J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(4): 340 - 343.
- [16] 闵玉涛, 王云龙, 李晨阳, 等. 抗 FLAG 标签单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(1): 93 - 97.
- [17] RUFF V A, LEACH K L. Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localization in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody [J]. *Biological Chemistry*, 1995, 270(38): 22602 - 22607.
- [18] PAGLINI G, PEREYRA E C, PAGLINI S. Cellular receptor for pixuna virus in chicken embryonic fibroblasts [J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2006, 195(2): 85 - 92.
- [19] KIM Y S, BOBBILII N K, PAEK K S, et al. Production of a monoclonal anti-myostatin antibody and the effects of in ovo administration of the antibody on posthatch broiler growth and muscle mass [J]. *Poultry Science*, 2006, 85(6): 1062 - 1071.
- [20] RENEGAR R H, CHALOVICH J M, LEINWEBER B D, et al. Localization of the actin-binding protein fesselin in chicken smooth muscle [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2009, 131(2): 191 - 196.
- [21] 王弘珺, 王颖超, 夏雪培, 等. 小鼠 *Foxp3* 片段的表达和多克隆抗体的制备[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(11): 27 - 30.
- [22] 姜飞, 刘小林, 李喜莲, 等. 小鼠 TRIM59 蛋白多克隆抗体的制备、鉴定与初步应用[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(12): 11 - 21.
- [23] 万里川, 周建光, 李杰之, 等. 小鼠 PC-1 蛋白兔多克隆抗体的制备及初步应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(12): 95 - 98.
- [24] 李明堂, 姜勇, 付玉. 猪白血抑制因子多克隆抗体的制备及其免疫定位[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2008, 34(1): 82 - 86.
- [25] 孔卫青, 李海芳, 刘涛, 等. 人 DFF45 蛋白多克隆抗体制备及其初步应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(2): 54 - 59.
- [26] OHNO Y, SUDA K, MASUKO K, et al. Production and characterization of highly tumor-specific rat monoclonal antibodies recognizing the extracellular domain of human L-type amino-acid transporter 1 [J]. *Cancer Science*, 2008, 99(5): 1000 - 1007.
- [27] SHIRAIISHI N, FURUYA A, TOKI H, et al. Anti-system ASC amino acid transporter 2 (ASCT2) antibody; USA, 08268592 [P]. 2012 - 09 - 18.

Rabbit Anti-Chicken Polyclonal Antibodies against $b^{0,+}$ AT, A Basic Amino Acid Transporter: Preparation and Specificity Analysis

SUN Yuping GAN Lufei* XIA Weiguang FENG Dingyuan ZUO Jianjun**

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To generate rabbit anti-chicken polyclonal antibodies against $b^{0,+}$ AT (a basic amino acid transporter), and identify its specificity, an antigen peptide was designed after bioinformatics analysis and forecast of physical and chemical properties, transmembrane regions, secondary structure and antigen epitope of $b^{0,+}$ AT according to its cDNA complete sequence (GenBank No. HQ338713). Then, chicken $b^{0,+}$ AT gene was cloned into *pET-32a(+)* vector to construct a plasmid of *pET-32a(+)-b^{0,+}AT*, and transformed into *E. coli* BL21, in which the fusion protein was induced to express. Rabbits were immunized with purified fusion protein for 3 times, and the antiserum was collected. Titer and specificity of $b^{0,+}$ AT antibody were detected by ELISA and Western blot. The results showed as follows: 1) chicken intestinal $b^{0,+}$ AT with a molecular weight 53.8 ku and isoelectric point 8.27 encodes 493 amino acids, including 33 alkaline amino acid residues (K, R), 28 acidic amino acid residues (D, E), 235 hydrophobic amino acid residues (A, I, L, F, W, V), and 122 polar amino acid residues (N, C, Q, S, T, Y). It was inferred that $b^{0,+}$ AT had 12 transmembrane helices, which was composed of 32.05% of alpha screw, 25.96% extension chain and 41.99% random coil. 2) Expressive plasmid of *pET-32a-b^{0,+}AT* was successfully constructed, and rabbit anti-chicken polyclonal antibody against $b^{0,+}$ AT with good specificity was obtained. The titer of purified polyclonal antibody was 1:204 800. 3) The anticipated specificity band was presented by Western blot with reaction of purified rabbit anti-chicken polyclonal antibody against $b^{0,+}$ AT and intestinal tissue membrane protein, and antibody appropriate dilution ratio was 1:4 000. The results suggest that the rabbit anti-chicken polyclonal antibody against $b^{0,+}$ AT with good specificity to membrane protein a successfully prepared and presents a good reaction to intestinal $b^{0,+}$ AT protein. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(5):1025-1036]

Key words: chicken; basic amino acid transporter; $b^{0,+}$ AT; polyclonal antibody

* Contributed equally

** Corresponding author, associate professor, E-mail: zuoj@scau.edu.cn