

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810063846.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月13日

[11] 公开号 CN 101241129A

[22] 申请日 2008.1.11

[21] 申请号 200810063846.4

[71] 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号

[72] 发明人 李 辉 石 慧 王启贵

[74] 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有限责任公司
代理人 刘 娅

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

一种鸡 A - FABP 抗血清制备及其在特异性鉴定中的应用方法

[57] 摘要

本发明提供了一种鸡 A - FABP 抗血清制备及特异性鉴定的应用方法, 根据鸡 A - FABP 基因序列扩增其编码区序列, 并将该序列分别构建到原核表达质粒 pGEX - 4T - 1 和真核表达质粒 pcDNA3 中, 得到鸡 A - FABP 基因的原核表达质粒 pGEX - 4T - 1/A - FABP 和真核表达质粒 pcDNA3/A - FABP。将原核表达质粒 pGEX - 4T - 1/A - FABP 转入到大肠杆菌感受态细胞 BL 21 (DE3) 中, 利用 IPTG 诱导使其表达鸡 A - FABP 融合蛋白, 融合蛋白经纯化后免疫家兔制备抗血清。利用本发明制备的抗血清进行抗体的特异性检测分析, 结果表明本发明所制备的抗血清可以特异性的识别小鼠肝脏中表达的鸡 A - FABP。进而利用本发明制备的抗血清检测了鸡 9 种组织中 A - FABP 的表达情况, 结果表明其仅在脂肪组织中表达。

1、一种鸡 A-FABP 抗血清制备方法，其特征是：

(1) 根据鸡 A-FABP 基因序列扩增其编码区序列，并将该序列分别构建到原核表达质粒 pGEX-4T-1 和真核表达质粒 pcDNA3 中，得到鸡 A-FABP 基因的原核表达质粒 pGEX-4T-1/A-FABP 和真核表达质粒 pcDNA3/A-FABP；

(2) 将原核表达质粒 pGEX-4T-1/A-FABP 转入到大肠杆菌感受态细胞 BL21 DE 中，利用 IPTG 诱导其表达鸡 A-FABP 融合蛋白，融合蛋白经纯化后免疫家兔制备抗血清。

2、根据权利要求 1 所述的制备方法得到的鸡 A-FABP 抗血清在特异性鉴定中的应用方法，其特征是：

(1) 将构建的真核表达质粒 pcDNA3/A-FABP 通过水动力转染法注入小鼠体内，使该真核表达质粒在小鼠肝脏中表达，然后提取小鼠肝脏蛋白与上述制备的抗血清进行抗体特异性分析；

(2) 分别取鸡的心脏、肝脏、腹脂、肌肉、肌胃、脾、小肠、肺和肾 9 种组织，利用上述制备的抗血清进行抗体特异性分析。

3、根据权利要求 2 所述的一种鸡 A-FABP 抗血清在特异性鉴定中的应用方法，其特征是：所述的水动力转染法是通过小鼠尾静脉快速注射真核表达质粒 pcDNA3/A-FABP 的方式实现的，即利用 5mL 医用注射器向每只小鼠尾静脉中注射体积为小鼠体重 10% 的重组质粒 pcDNA3/A-FABP 溶液，重组质粒 pcDNA3/A-FABP 为 10 ug，注射持续时间为 5-8s。

4、根据权利要求 2 所述的一种鸡 A-FABP 抗血清在特异性鉴定中的应用方法，其特征是：所述的抗体特异性分析方法是通过 Western blot 方法实现的。

5、根据权利要求 4 所述的一种鸡 A-FABP 抗血清在特异性鉴定中的应用方法，其特征是：所述的 Western blot 方法为：提取鸡的 9 种组织样蛋白并定量，按每种组织 100 μ g 上样，60V 稳压至蛋白跑过浓缩胶后，将电压调至 80V 稳压，电转移的条件是 200 mA 稳流 40min。

一种鸡 A-FABP 抗血清制备及其在特异性鉴定中的应用方法

(一) 技术领域

本发明属于分子生物学领域，特别是涉及一种抗血清制备和特异性鉴定的方法。

(二) 背景技术

近年来，脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白(A-FABP)作为影响肌内脂肪(Intamuscular fat, IMF)的重要候选基因之一，越来越受到人们的关注(Calnek B W et al, 1999; 许宁迎等, 2004)。目前，针对小鼠 A-FABP 基因的研究主要是构建敲除小鼠模型，通过研究野生型小鼠与 A-FABP 敲除型小鼠在脂肪酸的摄取情况、脂类分解代谢、脂类合成代谢、营养性肥胖诱导的胰岛素抗性以及脂肪细胞大小等方面的差异来揭示该基因的生物学功能(Hertzel et al, 2005; Hertzel et al, 2002; Coe et al, 1999; Shen et al, 2001)。针对猪 A-FABP 基因的研究主要是将其作为一个影响猪肌内脂肪代谢的候选基因，研究该基因的多态性与肌内脂肪(MF)含量的相关性(李楨等, 2004; Gerbens 等, 1998; Brockmann 等, 1996)。对于鸡 A-FABP 基因的研究与猪上的研究相似，主要是研究该基因的多态性与肌内脂肪沉积等脂肪性状的相关性(叶满红等, 2003; Wang 等, 2006; 李文娟等, 2006; 罗桂芬等, 2006)。

随着蛋白组学时代的到来，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，获取目的蛋白的抗血清是在蛋白质水平上研究基因功能的不可缺少的部分。常规的多克隆抗血清的制备方法包括抗血清的制备和抗血清特异性验证两部分。抗血清制备主要是获得质量好的抗原，通过静脉内、腹腔内、肌肉内、皮内、皮下或淋巴结内注射等方式免疫动物，最后收集和分离抗血清。抗血清特异性检测方法可归纳为以下三种。(1) Western blot分析抗血清与IPTG诱导的空载体转化的细菌裂解物以及相应原核表达的蛋白发生免疫反应的能力(羊键等, 2007); (2) Western blot分析抗血清与确定不含有目的抗原的样品的免疫反应情况(高瑞等, 2007; 兰玉菲等, 2007; 赵振东等, 2007; 王乃东等, 2006); (3) 用凝血酶将融合蛋白的标签(GST)切下，然后进行western blot分析抗血清分别与标签和目的蛋白发生免疫反应的情况(张宝红等, 2005)。这些方法均存在不同程度的局限性，不能彻底的证明所制备的抗血清是否为目标基因编码产物所产生的抗血清。

水动力转染法(Hydodynamics transfection, HD)是1999年出现的一种新的基因体内转染方法，它通过在高压下向小鼠尾静脉快速注射大体积含目的基因的生理盐水从而实现目的基

因在小鼠体内的高效表达。该方法的主要机理是高压作用引起内皮细胞和细胞膜破裂，从而使质粒进入细胞内部得到高效表达（Liu 等，1999）。水动力转染法技术具有快速、简单、方便、稳定、高效、安全等多方面的优点（Zhang 等，2004；胡锦涛等，2003）。自1999年建立该方法以来引起了很多研究者极大的兴趣，水动力转染可以被用来进行DNA、RNA、蛋白质和其它的一些不能通过膜渗透的物质转染（Liu 等，2001）。

（三）发明内容

本发明的目的是提供一种分子生物学技术，即利用鸡A-FABP原核表达蛋白免疫家兔制备鸡A-FABP抗血清，同时利用水动力转染法使鸡A-FABP在小鼠肝脏中表达，并检测所制备的抗血清特异性，进而应用该抗血清检测A-FABP在鸡不同组织中的表达情况，最终提出一种鸡A-FABP抗血清制备及特异性鉴定的方法。

本发明的鸡A-FABP抗血清制备方法是这样实现的：

1、原核和真核表达质粒的构建：根据鸡A-FABP基因序列扩增其编码区序列，并将该序列分别构建到原核表达质粒pGEX-4T-1和真核表达质粒pcDNA3中，得到鸡A-FABP基因的原核表达质粒pGEX-4T-1/A-FABP和真核表达质粒pcDNA3/A-FABP。

2、融合蛋白表达及抗血清制备：将原核表达质粒pGEX-4T-1/A-FABP转入到大肠杆菌感受态细胞BL21（DE）中，利用IPTG诱导其表达鸡A-FABP融合蛋白，融合蛋白经纯化后免疫家兔制备抗血清。

本发明制备方法得到的鸡A-FABP抗血清在特异性鉴定中的应用方法为：

1、抗体特异性检测：将构建的真核表达质粒pcDNA3/A-FABP通过水动力转染法注入小鼠体内，使该真核表达质粒在小鼠肝脏中大量表达，8h后取小鼠肝脏提取总蛋白，利用上述制备的抗血清进行抗体特异性分析。

2、A-FABP在鸡不同组织中的表达情况检测：分别取鸡的心脏、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，7000 r/min离心15 min取上清，利用上述制备的抗血清进行Western blot分析。

本发明鸡A-FABP抗血清在特异性鉴定中的应用方法还有这样一些技术特征：

1、所述的水动力转染法是通过小鼠尾静脉快速注射真核表达质粒pcDNA3/A-FABP的方式实现的，即利用5mL医用注射器向每只小鼠尾静脉中注射体积为小鼠体重10%的重组质粒pcDNA3/A-FABP溶液（一般为2.5mL左右），重组质粒pcDNA3/A-FABP为10 ug，注射持续时间为5-8s。

2、所述的抗体特异性分析方法是通过对Western blot方法实现的。

本发明巧妙的利用了原核表达蛋白制备的抗血清与该基因的真核表达蛋白进行交叉免疫反应来鉴定所制备的抗血清的特异性,有效的解决了常规方法制备多克隆抗血清的鉴定问题。同时在制备真核表达蛋白时,巧妙的使用了水动力转染法将真核表达质粒通过小鼠尾静脉注入小鼠体内,使外源基因在小鼠肝脏中大量表达。该发明方法操作简单、省时、省力,且费用低,为制备和鉴定多克隆抗血清提供了一种准确而有效的方法。

(四) 附图说明

图1是鸡A-FABP基因原核和真核表达质粒双酶切鉴定胶图;

图2是鸡A-FABP基因融合蛋白的诱导表达及纯化图;

图3是鸡A-FABP基因在小鼠肝脏中的表达情况示意图;

图4是抗血清与真核表达蛋白的交叉免疫反应示意图;

图5是A-FABP在鸡不同组织中的表达情况示意图。

(五) 具体实施方式

下面举例对本发明做更详细地描述:

实施例1: 鸡A-FABP基因原核表达及抗血清制备

一、实验材料

质粒提取和DNA胶回收试剂盒购自百泰克公司; pGEX-4T-1载体为本实验室保存; Glutathione Sepharose 4B购自Amersham公司; 各种限制性内切酶购自大连宝生物公司。

二、实验方法

1、A-FABP的扩增

根据NCBI提供的鸡A-FABP基因序列(Accession No: NM_204290)设计引物(上游引物: 5'-ga gaattc ATGTGCGACCAGTTTGTGGGC-3'; 下游引物: 5'-cg ctcgag CATGAAGACG GCTTCCTCAT GCTC-3'), 上游引物设计 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物设计 *Xho* I 酶切位点。从鸡的脂肪组织中提取总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 7min、30个循环(94°C 30s、55°C 30s、72°C 30s)、72°C 10min。用DNA胶回收试剂盒回收PCR产物。

2、重组表达质粒的构建

*Bam*H I / *Xho* I 双酶切PCR产物和 pGEX-4T-1载体, 纯化连接, 转化大肠杆菌DH5 α , 筛选重组表达质粒pGEX-4T / A-FABP。重组质粒采用 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切和测序鉴定, 确保构建的重组质粒的正确性。

3、A-FABP在大肠杆菌中的表达和纯化

将重组表达质粒pGEX-4T-1 / A-FABP转化大肠杆菌BL 21 (DE3), 37℃培养过夜。挑取单菌落接种于LB培养基, 37℃振荡培养过夜, 按1: 100转接到大三角瓶, 37℃振荡培养至OD₆₀₀在0.4-0.6之间时加入IPTG (终浓度为1 mmol/L) 诱导, 然后37℃振荡培养6 h, 7000 r/min离心3 min收集菌体。PBS重悬收集的菌体后超声破碎, 12000 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Brandford的方法测定蛋白浓度。

4、兔抗血清的制备

将纯化的GST / A-FABP溶于PBS中, 调整浓度为100 μg/ml, 取1 mL该溶液与等量的弗氏完全佐剂混合乳化, 采用背部皮下多点注射方式免疫家兔; 2周后进行一次加强免疫, 取1 mL该溶液与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化; 2周后再进行二次加强免疫, 取2 mL该溶液与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化。二次加强免疫1周后进行心脏采血, 分离血清, 采用间接ELISA方法检测抗血清效价, -20℃冻存。

三、实验结果

1、鸡A-FABP基因的获取

以鸡的脂肪组织cDNA为模板, 利用鸡A-FABP基因特异性上游和下游引物进行PCR扩增, 扩增片段长度为412 bp, 含A-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-1 / A-FABP, 重组质粒经*Bam*H I / *Xho* I 双酶切 (图1) 和测序鉴定, 证实A-FABP基因以正确的方向插入, 且与GST阅读框一致, 预计能够编码一个40 KDa融合蛋白。图1中M: DL2000; 1: 鸡A-FABP原核表达质粒双酶切结果; 2: 鸡A-FABP真核表达质粒双酶切结果。

2、A-FABP重组蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

将含有A-FABP基因的重组质粒pGEX-4T-1 / A-FABP转化大肠杆菌BL 21 (DE3) 中, 经IPTG诱导后裂解菌体, SDS-PAGE电泳显示外源性蛋白表达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电泳证实相对分子量约为40 KDa, 与预期大小相符 (图2)。图2中M: 蛋白Marker; 1: 纯化的A-FABP融合蛋白; 2: 转化A-FABP原核表达质粒的大肠杆菌提取物。

实施例2: 鸡A-FABP基因真核表达及抗血清鉴定

一、实验材料

质粒提取和DNA胶回收试剂盒购自百泰克公司；pcDNA3载体为本实验室保存；immobilon-p Transfer Membrane购自MiLLiPORE；辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔IgG和兔抗小鼠GAPDH IgG购自北京鼎国生物技术有限责任公司；增强型HRP-DAB底物显色试剂盒购自TIANGEN公司；Western blotting Luminol Reagent购自中杉金桥；各种限制性内切酶购自大连宝生物公司。

二、实验方法

1、重组质粒pcDNA3 / A-FABP在小鼠肝脏中的表达

利用质粒提取纯化试剂盒制备重组质粒pcDNA3 / A-FABP，然后测定重组质粒的浓度。将pcDNA3 / A-FABP质粒溶于灭菌的生理盐水中，调整浓度至4ng/uL。通过一种新的基因体内转染方法（即水动力转染法），将重组质粒pcDNA3 / A-FABP转入小鼠体内。该方法的主要机理是在高压下向小鼠尾静脉快速注射大体积含目的基因的生理盐水，引起毛细血管内皮细胞和肝细胞膜破裂，使目的基因瞬间进入肝细胞，从而实现目的基因在小鼠肝脏内的高效表达。

取4只体重大约为25g的小鼠，随机分成两组。第一组为重组质粒注射组，注射体积为小鼠体重10%的重组质粒溶液（大约2.5mL），重组质粒为10 ug，即利用5mL注射器向每只小鼠尾静脉中注射2.5mL重组质粒注射液（重组质粒pcDNA3 / A-FABP浓度为4ng/uL），注射持续时间为5-8s。第二组为对照组，注射体积同样为小鼠体重10%的生理盐水，即利用5mL注射器向每只小鼠尾静脉中注射2.5mL生理盐水，注射持续时间为5-8s。所有被注射的小鼠8h后被断颈椎处死，分别取肝脏提取总RNA，反转录成cDNA，以小鼠 β -actin基因为内参，利用鸡A-FABP基因特异性引物检测鸡A-FABP基因在小鼠肝脏中的表达情况。

2、抗血清与真核表达质粒表达蛋白的免疫反应检测

同样取4只体重大约为25g的小鼠，随机分成两组。按上述剂量和方法分别注射pcDNA3 / A-FABP重组质粒和生理盐水，8h后断颈椎处死小鼠，取肝脏提取总蛋白，利用本发明制备的抗血清进行Western blot分析。分离胶浓度为12%的聚丙烯酰胺凝胶，浓缩胶浓度为5%的聚丙烯酰胺凝胶。每种组织上样约100 μ g，组织样与等体积的上样Buffer混合，于沸水中变性10min。60V稳压至蛋白跑过浓缩胶后，将电压调至80V稳压至电泳结束。通过电转移的方法将蛋白转移到immobilon-p Transfer Membrane上，电转移的条件是200 mA 稳流40min。immobilon-p Transfer Membrane在5%脱脂乳中，4 $^{\circ}$ C过夜封闭。将本发明制备的兔抗血清1:3000稀释后用于检测鸡A-FABP的表达；内参为兔抗小鼠GAPDH IgG，稀释比例为1:1000。二抗为辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔IgG。免疫反应条件均为37 $^{\circ}$ C振荡孵育1h，目的基因用Western blotting Luminol Reagent显色，内参用增强型HRP-DAB底物显色试剂盒显色。

三、实验结果

1、利用水动力转染法将鸡A-FABP基因的真核表达质粒注入小鼠体内，8h后取小鼠肝脏，提取RNA，采用RT-PCR法检测小鼠肝脏中外源基因的表达情况，结果显示在注射pcDNA3 / A-FABP质粒的小鼠肝脏组织中有鸡A-FABP基因的表达，对照组仅有内参基因的表达而没有检测到外源基因的表达（图3），这说明水动力转染法可以有效的将外源基因转入到小鼠体内，并且使其在肝脏中表达。图3中M：DL2000；1：PCR阴性对照；2、3：注射pcDNA3 / A-FABP质粒的小鼠肝脏；4、5：注射生理盐水的小鼠肝脏。

2、利用水动力转染法将鸡A-FABP基因的真核表达质粒注入小鼠体内，8h后处死小鼠取肝脏，提取总蛋白进行Western blot分析，结果显示本发明制备的抗血清可以特异性识别小鼠肝脏中表达的鸡A-FABP，这一结果充分证明了本发明所制备的抗血清能特异性的与鸡A-FABP结合（图4）。图4中1：鸡脂肪组织；2、3：注射鸡A-FABP真核表达质粒的小鼠肝脏；4：注射生理盐水的小鼠肝脏；5：纯化的鸡A-FABP融合蛋白。

实施例3：鸡A-FABP抗血清的应用研究

一、实验材料

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。

二、实验方法

1、组织匀浆蛋白的制备

取鸡的心脏、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，7000 r/min离心15 min取上清，-20℃保存。

2、Western blot

提取鸡的9种组织样蛋白并定量，按每种组织约100 μg上样。60V稳压至蛋白跑过浓缩胶后，将电压调至80V稳压。电转移的条件是200 mA稳流40min。将本发明制备的兔抗血清1:3000稀释后用于检测鸡A-FABP的表达；内参为小鼠抗鸡GAPDH IgG，稀释比例为1:5000。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℃振荡孵育1h，用增强型HRP-DAB底物显色试剂盒显色。

三、实验结果

结合图5，Western blot分析结果显示，在检测的鸡9种组织中仅在脂肪组织中有杂交信

号, 图5中1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 脂肪; 4: 肌肉; 5: 肌胃; 6: 脾; 7: 小肠; 8: 肺; 9: 肾; 10: A-FABP融合蛋白。这与我们前期利用Northern blot方法在RNA水平上的研究结果(该基因仅在脂肪组织中表达)相一致, 并且该杂交信号的分子量与在小鼠肝脏中的杂交信号相一致, 这些结果进一步证明了本发明所制备抗血清的特异性, 并充分说明了本发明所制备的抗血清可以应用于鸡A-FABP的检测研究领域。



图 1

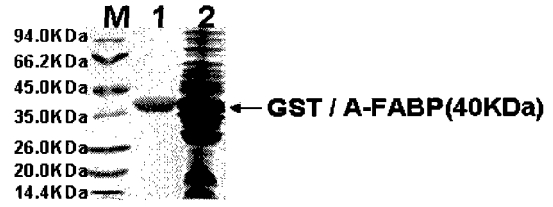


图 2

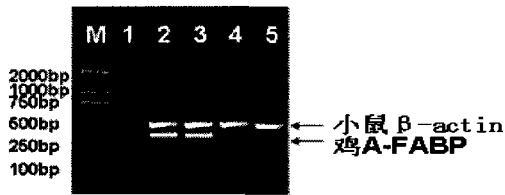


图 3

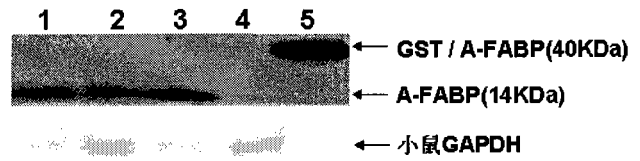


图 4

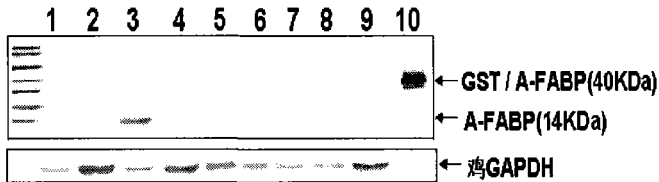


图 5

专利名称(译)	一种鸡A - FABP抗血清制备及其在特异性鉴定中的应用方法		
公开(公告)号	CN101241129A	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	CN200810063846.4	申请日	2008-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	李辉 石慧 王启贵		
发明人	李辉 石慧 王启贵		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
代理人(译)	刘娅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种鸡A - FABP抗血清制备及特异性鉴定的应用方法，根据鸡A - FABP基因序列扩增其编码区序列，并将该序列分别构建到原核表达质粒pGEX - 4T - 1和真核表达质粒pcDNA3中，得到鸡A - FABP基因的原核表达质粒pGEX - 4T - 1/A - FABP和真核表达质粒pcDNA3/A - FABP。将原核表达质粒pGEX - 4T - 1/A - FABP转入到大肠杆菌感受态细胞BL 21(DE3)中，利用IPTG诱导使其表达鸡A - FABP融合蛋白，融合蛋白经纯化后免疫家兔制备抗血清。利用本发明制备的抗血清进行抗体的特异性检测分析，结果表明本发明所制备的抗血清可以特异性的识别小鼠肝脏中表达的鸡A - FABP。进而利用本发明制备的抗血清检测了鸡9种组织中A - FABP的表达情况，结果表明其仅在脂肪组织中表达。



图 1

图 2



图 3

图 4



图 5