

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510011583.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/69 (2006.01)

C07K 14/465 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1333077C

[51] Int. Cl. (续)

A23K 1/00 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.4.15

[21] 申请号 200510011583.9

[73] 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市五山路 483 号

[72] 发明人 曹永长 覃健萍 毕英佐 舒鼎铭

马静云 谢青梅

[56] 参考文献

CN1120843A 1996.4.17

缩胆囊素的生物学功能研究进展 舒鼎铭,
饲料工业,第 25 卷第 11 期 2004

鲑鱼降钙素串联基因的克隆, 表达及重级
蛋白生物学活性 黄迎春等, 生物技术, 第 13 卷
第 6 期 2003

审查员 饶 刚

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 向 华

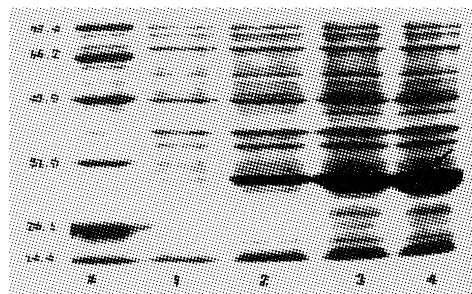
权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 3 页

[54] 发明名称

缩胆囊素活性片段的串联表达及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一个获得缩胆囊素活性片段多串联体的方法, 包括表达缩胆囊素基因的重组质粒的构建、缩胆囊素基因在大肠杆菌中的表达和缩胆囊素基因工程产物的纯化。表达缩胆囊素基因的重组质粒具有鸡缩胆囊素 33 基因或其多串联体的核苷酸序列, 缩胆囊素基因工程产物具有鸡缩胆囊素 33 肽或其多串联体的氨基酸残基序列。本发明进一步涉及重组缩胆囊素多肽对动物的主动免疫技术及其应用。



1. 一种编码缩胆囊素活性片段的核苷酸序列，其特征在于：它由两个或两个以上具有 SEQ ID NO: 1 的序列头尾串联而成。
2. 重组表达载体，含有权利要求 1 所述序列。
3. 宿主细胞或转化体，含有权利要求 2 所述的重组表达载体。
4. 一种缩胆囊素多肽，其特征在于：它由两个或两个以上具有 SEQ ID NO: 2 的序列头尾串联而成。
5. 获得权利要求 4 所述多肽的方法，包括：
 - a. 构建权利要求 2 所述重组表达载体；
 - b. 将重组表达载体转化大肠杆菌表达；
 - c. 分离纯化表达产物。
6. 基因工程疫苗，含有权利要求 4 所述多肽。
7. 权利要求 4 所述多肽在制备缩胆囊素抗体中的应用。
8. 权利要求 4 所述多肽在制备用于体外检测血清中缩胆囊素抗体水平的试剂中的应用。
9. 含有权利要求 4 所述缩胆囊素多肽的饲料添加剂。

缩胆囊素活性片段的串联表达及其应用

技术领域

本发明属于基因工程领域。具体涉及表达缩胆囊素基因的重组质粒的构建、缩胆囊素基因在大肠杆菌中的表达和缩胆囊素基因工程产物的纯化。本发明进一步涉及重组缩胆囊素多肽对猪、兔、牛、鸡等动物的主动免疫技术及其应用。

背景技术

缩胆囊素 (Cholecystokinin, CCK) 是一种调节动物采食量的有效因子。缩胆囊素又称胆囊收缩素或促胰酶素, 是由小肠粘膜的 I 细胞分泌的多肽类激素。CCK 前体为 130 个氨基酸, 逐步分解成为小分子的 CCK, 目前发现的 CCK 有 CCK-83, CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-12, CCK-8 和 CCK-4。其不同部位主要在羧基端, 但长度延伸在氨基端。餐后血浆中主要为大分子 CCK, 包括 CCK-58, CCK-39, CCK-33 和 CCK-12。这些大分子 CCK 经胰蛋白酶水解后均成为 8 肽的氨基酸残基, 即 CCK-8。CCK-8 具有 CCK 分子的全部活性, 与 8 肽的胃泌素结构相似, 都具有相同的氨基末端序列 Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, 该序列是 CCK 和胃泌素发挥其生物活性所必需的。CCK 存在于脑和胃肠道中, 是脑内含量较高的一种脑肠肽 (brain-gut peptide) 类物质。CCK 在各部位的含量则差别很大。在胃肠道, CCK 可以促进胆囊、胃和幽门括约肌的收缩; 促进远端十二指肠和空肠蠕动; 促进胆汁、胃酸、胰液的分泌; 增强胰酶的活性; 促进胰岛素、胰高血糖素、降钙素的释放; 调节胰多肽在肠道和胰液中的释放; 抑制胃排空等功能。CCK 受体有两种: CCK-A 受体和 CCK-B 受体, 其中 CCK-A 受体在外周器官含

量很高，而 CCK-B 受体在中枢神经系统中含量很高。CCK-A 受体有两个结合位点：高亲和力位点和低亲和力位点。近年来的研究表明 CCK 是和 CCK-A 的低亲和力位点结合使动物产生饱感从而使动物采食停止。

CCK 可以降低多种动物的采食量。CCK-A 受体基因敲除大鼠表现为肥胖、易饥饿、采食增加 (Schwartz 等, 1999)。研究发现，在多种动物中，无论是外源性 CCK，还是机体自身生成的内源性 CCK 都能使机体产生饱感 (Della 等, 1979, 1981; Gibbs 等, 1973; Mc Laughlin 等, 1980)。外源性注入 CCK 也会降低动物的采食量。中枢和外周引入 CCK 具有相同的降低采食量的作用，CCK 作为神经递质直接在脑内产生饱感。小剂量 CCK 就可以有效地抑制动物采食，在狗、鼠、兔、猴等多种哺乳动物及人体实验研究中发现，无论生理剂量或药理剂量的 CCK 都能抑制进食后的胃排空活动 (Doong 等, 1998)，进而抑制动物采食。血浆 CCK 浓度与胃排空率呈反比关系。

对 CCK 免疫的研究已经开展了较长时间，早期研究表明，利用免疫调控技术可有效调控体内激素的分泌，从而调节动物的生产性能 (Della 等, 1981; Lawrence 等, 1986; Pekas, 1991, 1993; Schanbacher 等, 1994)。目前，在猪和一些反刍动物上已有以 CCK 为抗原进行主动免疫和被动免疫的研究报道，结果表明对动物生产性能有一定的调控作用。Jens 等 (1978) 用 CCK-33 单独免疫兔子，在加强免疫 3 次后，获得了效价很高的抗 CCK-33 的抗血清，说明 CCK 有一定的抗原性，可以用来接种动物使之产生抗体。而国内，陈均辉 (1992) 用 CCK-8 大分子与牛血清蛋白 (BSA) 联结形成全抗原免疫兔子，加强免疫后也获得了高滴度的抗 CCK-8 抗血清。虽然 CCK 免疫调控在猪、羊上有一定效果，但为了在生产中能够应用该技术，必须

寻找到一种 CCK 免疫原, 其免疫用量少, 免疫过程方便可行, 抗体相对稳定、易于保存使用, 而且能大量生产抗体, 又符合动物保护法规的方法。

用 CCK 作抗原主动免疫动物可以提高动物的采食量和增重。Pekas 和 Trout (1990) 用 CCK 免疫生长猪后, 其采食量和增重分别提高了 8.2% 和 10.6%, 胴体重提高 8.7%, 体长增加 2.4%, 对瘦肉/脂肪的比值和蛋白质/脂肪的比值没有影响, 但 CCK 免疫猪的胴体瘦肉和脂肪重增加。由此可见, CCK 免疫后, 猪的生长速度增加是因为胴体增重增加, 但对胴体组成没有影响。McLaughlin 等 (1985) 用 CCK 主动免疫鼠后发现, 处理组比对照组的采食量增加了 9% ($P < 0.04$), 增重提高了 17% ($P < 0.02$)。这些研究结果表明应用 CCK 主动免疫动物对于动物的采食具有一定的促进作用, 但结论也仅限于一些哺乳动物, 对于其它动物方面的效果还有待进一步实验证实。

以上研究都是将化学合成的, 或者是从动物组织中分离纯化的 CCK 或其活性部分与大分子物质 (如 BSA 等) 偶联, 然后免疫动物。但还没有采用大肠杆菌表达 CCK 或其活性片段 (如 CCK-33 肽、CCK-8 肽) 的报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一个获得缩胆囊素活性片段多串联体的方法。

本发明提供的获得缩胆囊素活性片段多串联体的方法的关键, 是构建表达缩胆囊素 33 肽的多串联体的重组质粒。该质粒是采用基因工程方法获得的, 具体构建方法如下:

(1) 根据鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子, 设计合成 cck-33 基因, 基因序列为: GGTCTACTGGCCGCTTCTCTGTCCTTGGCAACCGTGACAGAGCATTGATCCGACG CACCGTATTAATGACCGTGACTACATGGGCTGGATGGATTTT。

(2) 将 cck-33 基因插入 pRSETA 质粒, 获得重组质粒 pRSETA-1CCK, 具体操作如下:

根据人工合成的 cck-33 基因设计特异性引物 P1 (5'-CATGGA TCCGGTTCTACTGGCCGCT-3') / P2 (5'-CATGAGCTCCCAAATCCATC CAGCC-3'), 采用 PCR 方法, 以人工合成的 cck-33 基因为模板, 扩增 cck-33 基因片段。。扩增 cck-33 基因片段的 PCR 反应体系 (200 μ L) 组成如下: 20 μ L 10 $\times$ buffer, 16 μ L dNTPs, 2 μ L Taq 酶, 1.5 μ L 引物 P1, 1.5 μ L 引物 P2, 0.5 μ L 人工合成的 cck-33 基因模板, 最后加水至总体积达到 200 μ L。PCR 温度循环程序如下: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 2~31: 94 $^{\circ}$ C 40 sec, 56 $^{\circ}$ C 40 sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec; 循环 32: 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到大小约 120bp 的特异性条带。

用 Sac I 和 BamH I 在 37 $^{\circ}$ C 分别消化 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接已消化的 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Ampr 抗性筛选, 获得插入了 cck-33 基因的转化子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 cck-33 基因的转化子进行 PCR 筛选。检测 cck-33 基因片段的 PCR 反应体系 (20 μ L) 组成如下: 2 μ L 10 $\times$ buffer, 1.6 μ L dNTPs, 0.2 μ L Taq 酶, 0.5 μ L 引物 P1, 0.5 μ L 引物 P2, 1 μ L 待检菌液, 最后加水至总体积达到 20 μ L。PCR 温度循环程序如下: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 2~31: 94 $^{\circ}$ C 40 sec, 56 $^{\circ}$ C 40 sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec; 循环 32: 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察

到大小约 120bp 的特异性条带。

对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振摇培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得重组质粒命名为 pRSETA-1CCK。

(3) 根据 BamH I 和 Bgl II 互为同尾酶的特性，构建 cck-33 基因 2 串联体（简称 2cck），具体操作如下：

将重组质粒 pRSETA-1CCK 用两组酶在 37℃进行消化：第一组用 BamH I 和 HindIII 进行消化，回收较小的片段；第二组用 Bgl II、HindIII 和 CIAP 进行消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得携带 2cck 的重组子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 2cck 的重组子进行 PCR 筛选。检测 2cck 的 PCR 反应体系（20 μ L）组成如下：2 μ L 10 $\times$ buffer，1.6 μ L dNTPs，0.2 μ L Taq 酶，0.5 μ L 引物 P1，0.5 μ L 引物 P2，1 μ L 待检菌液，最后加水至总体积达到 20 μ L。PCR 温度循环程序如下：循环 1：94℃ 3 min；循环 2~31：94℃ 40 sec，56℃ 40 sec，72℃ 60sec；循环 32：72℃ 10 min。扩增产物在 4℃保存。用 2%琼脂糖凝胶（含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭，EB）电泳检测 PCR 产物，观察到约 230bp 的特异性条带。

对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振摇培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-2CCK。

(4) 在 pRSETA-2CCK 的基础上构建 cck-33 基因的 4 串联体（简称 4cck），具体操作如下：

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用两组酶在 37℃ 进行消化：第一组用 BamH I 和 HindIII 进行消化，回收较小的片段；第二组用 Bgl II、HindIII 和 CIAP 进行消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得携带 4cck 的重组子。然后用特异性引物 P3 (5' -GATAAGGATCGATG GGGATCC-3') / P4 (5' -ATGGTACCAGCTGCAGATCT-3') 对含有 4cck 的重组子进行 PCR 筛选。对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振荡培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-4CCK。

采用相同的方法，分别获得携带 CCK-33 基因 6 串联体（简称 6cck）、8 串联体（简称 8cck）的重组质粒，相应地命名为 pRSETA-6CCK、pRSETA-8CCK。

获得表达 CCK-33 肽多串联体的重组质粒后，用重组质粒转化大肠杆菌，获得表达 CCK-33 肽多串联体的基因工程菌，然后在 IPTG 的诱导之下，表达 CCK-33 肽多串联体，并对表达产物进行鉴定和纯化。以 CCK-33 肽 4 串联体（简称 4CCK）的表达为例，方法如下：

(1) 经测序鉴定的重组质粒 pRSETA-4CCK 转化 E. coli BL-21 (DE3) 受体菌，挑取单个重组菌落，接种于 3 mL LA 液体培养基中，37℃ 振荡培养 5 h 后，用特异性引物 P3/P4 进行 PCR 鉴定，阳性菌为可表达 cck-33 基因 4 串联体的基因工程菌，命名为 E-4CCK。

(2) 取 E-4CCK 在 LA 平板上于 37℃ 划线培养 16~20 小时。挑取单个菌落在 LA 液体培养基中于 37℃ 培养 12~16 小时，将菌液置于 4℃ 冰箱保

存。按 1%比例接种 LA 液体培养基, 37℃, 200 r/m 振荡培养至 OD600 值达 0.5 左右时, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 分别在加入 IPTG 后 0、1、2、3、4 小时取菌液, 用 SDS-PAGE 进行鉴定。用 CCK 阳性血清对表达的融合蛋白进行 Western Blot 分析。

SDS-PAGE 方法如下: 将细菌悬液于 10 000 r/m 离心 1 min, 取沉淀。加入一定量的双蒸水, 重悬细菌。将样品保存在 4℃冰箱备用。参照汪家政等(2000)编《蛋白质手册》方法制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)。成层胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12~15%, 根据所检测的目的产物的分子量而定。将待检样品煮沸 5 min, 取 10 μ L 加入凝胶点样孔中, 在电场作用下进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸。电压为 80 v/cm, 待溴酚蓝到达成层胶底部时电压升高到 160 v/cm。待溴酚蓝接近凝胶底部时, 停止电泳, 取下凝胶, 置于 1%考马斯亮蓝溶液中染色过夜, 用脱色液脱色。

Western Blot 分析方法如下: SDS-PAGE 电泳结束后, 不对凝胶进行染色。剪一张与凝胶相同大小的硝酸纤维素膜及两张滤纸, 与电泳之后的凝胶一起在室温浸泡在转移缓冲液中 15min, 按海绵-滤纸-凝胶-硝酸纤维素膜-滤纸-海绵的顺序安装转印夹。将夹中有膜的一侧接正极, 并在 15V 的电压下转移 1.5h。转移后的膜用 5%脱脂奶粉封闭过夜, 弃去封闭液, 用 TBS 洗膜三次。弃去 TBS, 加入用 1%脱脂奶粉 1000 倍稀释的兔抗 CCK-8 肽阳性血清(SIGMA 公司), 温和振荡 3h。弃去一抗血清, 用 TBS 洗膜三次, 每次约 10min。弃去 TBS, 加入用 1%脱脂奶粉 50 倍稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 华美公司), 温和振荡至少 1 h。弃去二抗, 用 TBS 洗膜三次, 每次约 30min。弃去 TBS, 加入 DAB 溶液显色, 轻摇

硝酸纤维素膜，待显色达一定程度，用双蒸水洗膜终止显色反应。

(3) 将 IPTG 诱导表达的 E-4CCK 菌体收集后，于 0℃ 冰浴上进行超声破碎、离心后，沉淀用 8mol/L 的尿素进行溶解。用 50%Ni-NTA 纯化树脂在变性条件下进行纯化。具体操作如下：

将 1 000 mL 基因工程菌 E-4CCK 在 IPTG 诱导表达 4h 取样，4℃ 10 000 r/m 离心 2min，收集菌体并保存在 -20℃；将表达的保存细菌菌体沉淀置冰上解冻 15min，加 20mL Buffer B 悬浮细菌，将悬浮液在冰浴条件下置摇床上温和摇动 30min，充分变性裂解包涵体，然后在冰浴中进行超声破碎，超声时间为 6 秒，间隔时间为 8 秒，功率为 400W，破碎次数 40 次。4℃ 10 000 r/m 离心 20min，取上清液进行纯化。

将纯化柱中装入 20mL 的 Buffer B，将 50%Ni-NTA 纯化树脂混匀，取出 4mL 装柱，待树脂沉淀好后，将纯化柱的开关关闭，用 Buffer B 平衡纯化柱，约需 12h。用 Buffer B 清洗纯化柱。待 Buffer B 即将流尽（但不能流干）时将裂解上清 2mL 缓慢加入到纯化柱中，然后依次用 4mL Buffer C、4mL Buffer D、4mL Buffer E 过柱洗脱，并分别收集样品。将以上样品进行 SDS-PAGE 分析。纯化用缓冲液 Buffer B、Buffer C、Buffer D、Buffer E 必须新鲜配制，其组成如下：

Buffer B: 100 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L Tris HCL、8 mol/L 尿素，pH8.0；

Buffer C: 100 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L Tris-HCL、8 mol/L 尿素，pH6.3；

Buffer D: 100 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L Tris-HCL、8 mol/L 尿

素, pH5.9;

Buffer E: 100 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L Tris-HCL、8 mol/L 尿素, pH4.5。

经 50%Ni-NTA 树脂纯化的蛋白再用透析袋透析。用棉绳将透析袋的一侧系紧, 将适量的蛋白纯化溶液装在透析袋内, 再将透析袋的另一侧用棉绳系紧; 将装有纯化蛋白的透析袋放置在大体积的透析液 I 中, 4℃下在磁力搅拌器上进行搅拌 4~5 h。依次更换透析液 II、III、IV、V、VI、VII、VIII, 重复上述操作过程。最后透析袋放置在大体积的生理盐水中, 4℃下在磁力搅拌器上进行搅拌 4~5 h。透析袋埋在硅胶里进行蛋白浓缩, 将浓缩后的蛋白取出放在 4℃冰箱保存。透析液的组成如下:

透析液 I: 6 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH4.5;

透析液 II: 6 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH5.5;

透析液 III: 4 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH5.5;

透析液 IV: 4 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH6.5;

透析液 V: 2 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH6.5;

透析液 VI: 2 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH7.5;

透析液 VII: 10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH7.5;

透析液 VIII: 10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH8.5。

本发明提供的表达 CCK-33 肽多串联体的重组质粒的特征为:

(1) 本发明提供的重组质粒 pRSETA-1CCK、pRSETA-2CCK、pRSETA-4CCK、pRSETA-6CCK、pRSETA-8CCK 都具有序列表中序列 1 的核苷酸序列, 或序列 1 的串联体序列。序列 1 又称为 cck-33 基因, 由 99 个碱基对组成, 是根

据鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子而设计的。序列 1 的串联体序列，是用若干个碱基将两个 cck-33 基因以首尾相连的方式，将若干个 cck-33 基因连接起来形成的序列。对于序列 1 和序列 1 的多串联体，采用 PCR 方法可以扩增出特异性条带，也可以采用 DNA 序列测定的方法进行确定。

(2) 本发明提供的重组质粒的表达产物具有序列表中序列 2 的氨基酸序列，或序列 2 的串联体序列。序列 2 又称为 CCK-33 肽，是由序列 1 编码的。序列 2 的串联体序列，是用若干个氨基酸将两个 CCK-33 肽以首尾相连的方式，将若干个 CCK-33 肽连接起来形成的序列。采用抗 CCK-33 肽的特异性抗体，或者抗 CCK-8 肽的特异性抗体，或者抗其它形式的 CCK 的特异性抗体，都可以检测到该多肽产物。

(3) 本发明提供的重组质粒还包括具有 cck 等同序列的质粒。cck 等同序列，是与 cck-33 基因的核苷酸序列，或 CCK-33 肽的氨基酸残基序列相比有一个或若干个核苷酸或氨基酸残基的差别，包括碱基或氨基酸残基的改变、缺失、添加、或插入，或与 cck-33 基因序列中的连续 24 个碱基以上的区段有 75%以上的同源性。

本发明提供的重组 CCK-33 肽多串联体具有重要的应用价值。应用之一是将所述的重组 CCK-33 肽多串联体作为抗原，采用重组 CCK-33 肽多串联体直接免疫或将其与佐剂同时免疫猪、牛、兔、鸡等动物，可以促进动物采食，提高生产性能。

本发明提供的重组 CCK-33 肽多串联体的第二个应用，是采用重组 CCK-33 肽多串联体直接免疫或将其与佐剂配合制成疫苗免疫蛋鸡，通过收

集免疫鸡的鸡蛋，可以大量获得抗 CCK 的特异性抗体。

本发明提供的重组 CCK-33 肽多串联体的另一个应用，是将所述的重组 CCK-33 肽多串联体作为抗原，应用于包括但不限于 ELISA（酶联免疫吸附试验），检测动物血清中的 CCK 特异性抗体。

本发明具有明显的优点和效果。（1）本发明根据大肠杆菌偏爱密码子设计基因序列，采用基因工程的方法表达 CCK-33 肽多串联体，表达量高，成本低。（2）本发明获得的 CCK-33 肽多串联体具有很好的免疫原性。CCK 在动物体内主要以羟基端酰胺化的 CCK-8 和 CCK-33 的形式存在。由于 CCK-33 和 CCK-8 的分子量太小，不能直接作为抗原免疫动物，一般需要将它们与大分子物质（如 BSA）偶联。而本发明将 CCK-33 肽进行串联，获得的 CCK-33 肽多串联体分子量大，抗原位点增加，免疫原性好，因此不需要与大分子物质偶联就可以作为抗原免疫动物。和化学合成方法获得 CCK 蛋白相比，该方法具有明显的优点。

以下结合实施例和附图对本发明提供的表达 CCK-33 肽多串联体质粒的构建、表达产物的特征分析、应用途径作具体说明。

附图说明

图 1 为 cck-33 基因及其多串联体构建示意图。pRSET A 为克隆质粒载体，pRSETA-1CCK 为插入了 cck-33 基因的重组质粒，pRSETA-2CCK 为插入了 cck-33 基因 2 串联体(2cck)的重组质粒，pRSETA-4CCK 为插入了 cck-33 基因 4 串联体（4cck）的重组质粒，pRSETA-6CCK 为插入了 cck-33 基因 6 串联体（6cck）的重组质粒，pRSETA-8CCK 为插入了 cck-33 基因 8 串联体（8cck）的重组质粒。BamH I、HindIII、Bgl II、Sac I 是质粒上的限制性

内切酶位点。

图 2 为 cck-33 基因及其多串联体的 PCR 鉴定结果图。泳道 1 或 2 是 cck-33 基因及其多串联体的 PCR 产物,泳道 M 为 DNA 分子量标记。A 为 cck-33 基因 PCR 产物, B 为 cck-33 基因 4 串联体 (4cck) PCR 产物, C 为 cck-33 基因 8 串联体 (8cck) PCR 产物。

图 3 为用限制性内切酶 BamH I 和 HindIII 分别对重组质粒 pRSETA-1CCK、pRSETA-2CCK、pRSETA-4CCK、pRSETA-6CCK 和 pRSETA-8CCK 进行双酶切的电泳鉴定图。M 为 DNA 分子量标准 DL2 000; 1 泳道为 pRSETA-1CCK 质粒酶切产物,外源片断大小约为 120 bp; 2 泳道为 pRSETA-2CCK 质粒酶切产物,外源片断大小约为 230 bp; 3 泳道为 pRSETA-4CCK 质粒酶切产物,外源片断大小约为 450 bp; 4 泳道为 pRSETA-6CCK 质粒酶切产物,外源片断大小约为 700 bp; 5 泳道为 pRSETA-8CCK 质粒酶切产物,外源片断大小约为 1 100 bp。

图 4 为大肠杆菌表达 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 表达产物的 SDS-PAGE (12%) 检测图。M 为蛋白质分子量标准; 1~5 泳道为在 1mmol/L 的 IPTG 诱导下的含有 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 表达产物的细菌裂解物,诱导表达时间分别为 0h、1 h、2h、3h 和 4h。箭头所指为 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 表达产物。

图 5 为大肠杆菌表达的 CCK-33 肽 6 串联体 (6CCK) 表达产物的 SDS-PAGE (12%) 检测图。M 为蛋白质分子量标准; 1~4 泳道为在 1mmol/L 的 IPTG 诱导下的含有 CCK-33 肽 6 串联体 (6CCK) 表达产物的细菌裂解物,诱导表达时间分别为 0h、1 h、2 h 和 3h。箭头所指为 CCK-33 肽 6 串联体 (6CCK)

表达产物，分子量约为 27 kD。

图 6 为 CCK-33 肽 4 串联体表达产物的免疫印迹 (western blot) 检测图。M 为蛋白质分子量标准；1 为 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 表达产物。

图 7 为 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 表达产物亲和层析纯化过程中不同阶段组分的 SDS-PAGE 检测图。M 为蛋白质分子量标准；1~2 为洗脱液 E 洗脱组分；3 为洗脱液 D 洗脱组分；4 为洗脱液 C 洗脱组分；5~6 为洗脱液 B 洗脱组分；7 为未经纯化的含有 4CCK 表达产物的细菌裂解物；8 为不含有 4CCK 表达产物的细菌裂解物。

图 8 为 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 融合蛋白透析后的 SDS-PAGE 检测图。M 为蛋白分子量标准；1-2 泳道为透析后的 4CCK 融合蛋白，分子量约为 21 kD。

实施方法

1、 表达缩胆囊素 33 肽的重组质粒的构建

首先根据鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子，设计合成 cck-33 基因，基因序列为：GGTTCTACTGGCCGCTTCTCTGTCCTTGGCAACCGTGTACAGAGCATTGATCCGACGCACCGTATTAATGACCGTGACTACATGGGCTGGATGGATTTT。然后，将 cck-33 基因插入 pRSETA 质粒，获得重组质粒 pRSETA-1CCK，具体操作如下：

根据人工合成的 cck-33 基因设计特异性引物 P1 (5' -CATGGA TCCGGTTCTACTGGCCGCT-3') /P2 (5' -CATGAGCTCCCAAATCCATC CAGCC-3')，采用 PCR 方法，以人工合成的 cck-33 基因为模板，扩增 cck-33 基因片段。扩增 cck-33 基因片段的 PCR 反应体系 (200 μ L) 组成如下：20 μ L

10 × buffer, 16 μL dNTPs, 2 μL Taq 酶, 1.5 μL 引物 P1, 1.5 μL 引物 P2, 0.5 μL 人工合成的 cck-33 基因模板, 最后加水至总体积达到 200 μL。PCR 温度循环程序如下: 循环 1: 94℃ 3 min; 循环 2~31: 94℃ 40 sec, 56℃ 40 sec, 72℃ 60sec; 循环 32: 72℃ 10 min。扩增产物在 4℃ 保存。用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到特异性条带。

用 Sac I 和 BamH I 在 37℃ 分别消化 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接消化的 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α。经 Amp^r 抗性筛选, 获得插入了 cck-33 基因的转化子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 cck-33 基因的转化子进行 PCR 筛选。检测 cck-33 基因片段的 PCR 反应体系 (20 μL) 组成如下: 2 μL 10 × buffer, 1.6 μL dNTPs, 0.2 μL Taq 酶, 0.5 μL 引物 P1, 0.5 μL 引物 P2, 1 μL 待检菌液, 最后加水至总体积达到 20 μL。PCR 温度循环程序如下: 循环 1: 94℃ 3 min; 循环 2~31: 94℃ 40 sec, 56℃ 40 sec, 72℃ 60sec; 循环 32: 72℃ 10 min。扩增产物在 4℃ 保存。用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到特异性条带 (图 2)。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37℃, 200 r/m 振荡培养 16~20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得重组质粒命名为 pRSETA-1CCK。

2、表达缩胆囊素 33 肽 2 串联体 (2CCK) 的重组质粒的构建

在获得表达 CCK-33 肽重组质粒 pRSETA-1CCK 的基础上, 根据 BamH I 和 Bgl II 互为同尾酶的特性, 构建 cck-33 基因的 2 串联体 (2cck), 具体

操作如下:

将重组质粒 pRSETA-1CCK 用两组酶在 37℃ 进行消化: 第一组用 BamH I 和 HindIII 进行消化, 回收较小的片段; 第二组用 Bgl II、HindIII 和 CIAP 进行消化, 回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Ampr 抗性筛选, 获得携带 2cck 的重组子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 CCK-33 基因 2 串联体的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施方法 1”。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37℃, 200 r/m 振摇培养 16~20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得的重组质粒命名为 pRSETA-2CCK。

3、表达缩胆囊素 33 肽 4 串联体 (4CCK) 的重组质粒的构建

在获得表达缩胆囊素 33 肽 2 串联体 (2CCK) 重组质粒 pRSETA-2CCK 之后, 在 pRSETA-2CCK 的基础上, 根据 BamH I 和 Bgl II 互为同尾酶的特性, 构建表达 CCK33 肽 4 串联体 (4CCK) 的重组质粒, 具体操作如下:

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用两组酶在 37℃ 进行消化: 第一组用 BamH I 和 HindIII 进行消化, 回收较小的片段; 第二组用 Bgl II、HindIII 和 CIAP 进行酶消化, 回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Ampr 抗性筛选, 获得携带 CCK-33 基因 4 串联体 (4cck) 的重组子。然后用特异性引物 P3 (5' -GATAAGGATCGATGGGGATCC-3') /P4 (5' -ATGGTACCAGCTGCAGATCT-3') 对含有 4cck 的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施方法 1”。电泳检测 PCR 产物, 观察到特异性条带 (图 2)。对 PCR 筛选阳性的

细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振摇培养 16 ~ 20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-4CCK。

4、表达缩胆囊素 33 肽 6 串联体（6CCK）的重组质粒的构建

在获得表达缩胆囊素 33 肽 2 串联体（2CCK）重组质粒 pRSETA-2CCK 和表达缩胆囊素 33 肽 4 串联体（4CCK）重组质粒 pRSETA-4CCK 之后，根据 BamH I 和 Bgl II 互为同尾酶的特性，构建表达 CC-K33 肽 6 串联体（6CCK）的重组质粒，具体操作如下：

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用 BamH I 和 HindIII 在 37℃ 进行消化，回收较小的片段；将重组质粒 pRSETA-4CCK 用 Bgl II、HindIII 和 CIAP 进行消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得携带 6cck 的重组子。然后用特异性引物 P3/P4 对含有 6cck 的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施方法 1”。对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振摇培养 16 ~ 20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-6CCK。

5、表达缩胆囊素 33 肽 8 串联体（8CCK）的重组质粒的构建

在获得表达缩胆囊素 33 肽 2 串联体（2CCK）重组质粒 pRSETA-2CCK 和表达缩胆囊素 33 肽 6 串联体（6CCK）重组质粒 pRSETA-6CCK 之后，根据 BamH I 和 Bgl II 互为同尾酶的特性，构建表达 CCK-33 肽 8 串联体（8CCK）的重组质粒，具体操作如下：

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用 BamH I 和 HindIII 在 37℃ 进行消化：回收

较小的片段；将重组质粒 pRSETA-6CCK 用 Bgl II、HindIII 和 CIAP 进行消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Ampr 抗性筛选，获得携带 cck-33 基因 8 串联体 (8cck) 的重组子。然后用特异性引物 P3/P4 对含有 8cck 的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施方法 1”。电泳检测 PCR 产物，观察到特异性条带 (图 2)。对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振荡培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-8CCK。

6、缩胆囊素 33 肽 4 串联体 (4CCK) 在大肠杆菌中的表达与鉴定

首先，将经过测序鉴定的重组质粒 pRSETA-4CCK 转化 E. coli BL-21 (DE3) 受体菌，挑取单个重组菌落，接种于 3 mL LA 液体培养基中，37℃振荡培养 5 h 后，用特异性引物 P3/P4 做 PCR 鉴定，阳性菌为可表达 4CCK 的基因工程菌，命名为 E-4CCK。

然后，取 E-4CCK 在 LA 平板上于 37℃划线培养 16~20 小时。挑取单个菌落在 LA 液体培养基中于 37℃培养 12~16 h，将菌液置于 4℃冰箱保存。按 1%比例接种 LA 液体培养基，37℃，200 r/m 振荡培养至 OD600 值达 0.5 左右时，加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，分别在加入 IPTG 后 0、1、2、3、4 h 取菌液，用 SDS-PAGE 进行鉴定。用 CCK 阳性血清对表达的融合蛋白进行 Western Blot 分析。

SDS-PAGE 方法如下：将细菌悬液于 10 000 r/m 离心 1 min，取沉淀。加入一定量的双蒸水，重悬细菌。将样品保存在 4℃冰箱备用。参照汪家政等 (2000) 编《蛋白质手册》方法制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE)。

成层胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%。将待检样品煮沸 5 min，取 10 μ L 加入凝胶点样孔中，在电场作用下进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸。电压为 80 v/cm，待溴酚蓝到达成层胶底部时电压升高到 160 v/cm。待溴酚蓝接近凝胶底部时，停止电泳，取下凝胶，置于 1%考马斯亮蓝溶液中染色过夜，用脱色液脱色。电泳结果（图 4）表明，4CCK 融合蛋白的分子量约为 21 kD。随着诱导时间的延长，表达产物的量逐步增加，3h 后趋于稳定。用 VL 凝胶成像系统 BioID++程序对电泳结果进行扫描分析，结果如下（表 1）。

表 1 CCK33 肽 4 串联体（4CCK）在细菌总蛋白中的含量（%）

诱导时间 (h)	1	2	3	4
4CCK (%)	24.0	25.1	25.6	25.8

Western Blot 分析方法如下：SDS-PAGE 电泳结束后，不对凝胶进行染色。剪一张与凝胶相同大小的硝酸纤维素膜及两张滤纸，与电泳之后的凝胶一起在室温浸泡在转移缓冲液中 15 min，按海绵-滤纸-凝胶-硝酸纤维素膜-滤纸-海绵的顺序安装转印夹。将夹中有膜的一侧接正极，并在 15V 的电压下转移 1.5 h。转移后的膜用 5%脱脂奶粉封闭过夜，弃去封闭液，用 TBS 洗膜三次。弃去 TBS，加入用 1%脱脂奶粉 1000 倍稀释的兔抗 CCK-8 肽阳性血清（Sigma 公司），温和振摇 3h。弃去一抗血清，用 TBS 洗膜三次，每次约 10min。弃去 TBS，加入用 1%脱脂奶粉 50 倍稀释的二抗（辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体，华美公司），温和振摇至少 1h。弃去二抗，用 TBS 洗膜三次，每次约 30min。弃去 TBS，加入 DAB 溶液显色，轻摇硝酸纤维素膜，待显色达一定程度，用双蒸水洗膜终止显色反应。在 21 kD 位

置可见一特异性条带（图6）。

7 缩胆囊素 33 肽 4 串联体（4CCK）的纯化

将 IPTG 诱导表达的 E-4CCK 菌体收集后，于 0℃冰浴上进行超声破碎、离心后，沉淀用 8 mol/L 的尿素进行溶解。用 50%Ni-NTA 纯化树脂在变性条件下进行纯化。具体操作如下：

将 1 000 mL 基因工程菌 E-4CCK 在 IPTG 诱导表达 4 h 取样，4℃10 000 r/m 离心 2 min，收集菌体并保存在-20℃；将保存的细菌菌体沉淀置冰上解冻 15min，加 20mL Buffer B 悬浮细菌，将悬浮液在冰浴条件下置摇床上温和摇动 30 min，充分变性裂解包涵体，然后在冰浴中进行超声破碎，超声时间为 6 秒，间隔时间为 8 秒，功率为 400W，破碎次数 40 次。4℃10 000 r/m 离心 20 min，取上清进行纯化。

往纯化柱中装入 20mL 的 Buffer B，将纯化树脂 50%Ni-NTA 混匀，取出 4mL 装柱，待树脂沉淀好后，将纯化柱的开关关闭，用 Buffer B 平衡纯化柱，约需 12 h。用 Buffer B 清洗纯化柱。待 Buffer B 即将流尽（但不能流干）时将裂解上清 2mL 缓慢加入到纯化柱中，然后依次用 4mL Buffer C、4mL Buffer D、4mL Buffer E 过柱洗脱，并分别收集样品。纯化用缓冲液 Buffer B、Buffer C、Buffer D、Buffer E 必须新鲜配制，其组成如下：

Buffer B: 100 mmol/L NaH₂PO₄、10 mmol/L Tris HCL、8 mol/L 尿素，pH8.0；

Buffer C: 100 mmol/L NaH₂PO₄、10 mmol/L Tris-HCL、8 mol/L 尿素，pH6.3；

Buffer D: 100 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L Tris-HCL、8 mol/L 尿素, pH5.9;

Buffer E: 100 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L Tris-HCL、8 mol/L 尿素, pH4.5。

将以上样品进行 SDS - PAGE 分析, 可见 Buffer E 的洗脱物中有较纯的目的蛋白 (图 7)。

经 50%Ni-NTA 树脂纯化的蛋白再用透析袋透析。用棉绳将透析袋的一侧系紧, 将适量的蛋白纯化溶液装在透析袋内, 再将透析袋的另一侧用棉绳系紧; 将装有纯化蛋白的透析袋放置在大体积的透析液 I 中, 4℃下在磁力搅拌器上进行搅拌 4~5 h。依次更换透析液 II、III、IV、V、VI、VII、VIII, 重复上述操作过程。透析液的组成如下:

透析液 I: 6 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH4.5;

透析液 II: 6 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH5.5;

透析液 III: 4 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH5.5;

透析液 IV: 4 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH6.5;

透析液 V: 2 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH6.5;

透析液 VI: 2 mol/L 尿素、10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH7.5;

透析液 VII: 10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH7.5;

透析液 VIII: 10 mmol/L Tris-HCL、0.1mol/L NaH_2PO_4 , pH8.5。

最后透析袋放置在大体积的生理盐水中, 4℃下在磁力搅拌器上进行搅拌 4~5 h。透析袋埋在硅胶里进行蛋白浓缩, 将浓缩后的蛋白取出放在 4℃冰箱保存。将浓缩后的蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 电泳图上可见透析后的

蛋白只有一条带（图 8）。

8、缩胆囊素 33 肽 6 串联体（6cck）在大肠杆菌中的表达

首先，将经过测序鉴定的重组质粒 pRSETA-6CCK 转化 E. coli BL-21（DE3）受体菌，挑取单个重组菌落，接种于 3 mL LA 液体培养基中，37℃振摇培养 5 h 后，用特异性引物 P3/P4 做 PCR 鉴定，阳性菌为可表达 6CCK 的基因工程菌，命名为 E-6CCK。

然后，取 E-6CCK 在 LA 平板上于 37℃划线培养 16~20 小时。挑取单个菌落在 LA 液体培养基中于 37℃培养 12~16 小时，将菌液置于 4℃冰箱保存。按 1%比例接种 LA 液体培养基，37℃，200 r/m 振摇培养至 OD600 值达 0.5 左右时，加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，分别在加入 IPTG 后 0、1、2、3h 取菌液，用 SDS-PAGE 进行分析。SDS-PAGE 方法参照实施方法 6。电泳结果（图 5）表明，6CCK 融合蛋白的分子量约为 27 kD。随着诱导时间的延长，表达产物的量逐步增加，3h 后趋于稳定。用 VL 凝胶成像系统 BioID++程序对电泳结果进行扫描分析，结果如下（表 2）。

表 2 CCK33 肽 6 串联体（6CCK）在细菌总蛋白中的含量（%）

诱导时间（h）	1	2	3
6CCK（%）	24.1	32.1	34.6

10 血清 CCK 抗体的 ELISA 检测

以纯化的 4CCK 融合蛋白为抗原，建立检测血清 CCK 抗体的酶联免疫吸附试验（ELISA）方法。用方阵法，将纯化的 4CCK 融合蛋白以 10⁻¹⁰、10⁻²⁰、10⁻⁴⁰、10⁻⁸⁰、10⁻¹⁶⁰、10⁻³²⁰、10⁻⁶⁴⁰ 的比例用包被缓冲液稀释，每孔加入 100 μL 4℃包被过夜。弃去包被液，每孔用 200 μL 清洗缓冲

液洗酶标板 3 次, 在纱布上拍干清洗缓冲液后, 每孔加入封闭液 (5% 脱脂奶粉) 100 μ L, 37℃ 封闭 2 h。弃去封闭液, 每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次, 在纱布上拍干清洗缓冲液, 每孔加入以 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的比例用稀释缓冲液稀释的一抗 (免抗 CCK 阳性血清或免疫前的免阴性血清, 其中 CCK 阳性血清购自华西医科大学) 100 μ L, 37℃ 反应 1 h。弃去一抗, 每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次, 在纱布上拍干清洗缓冲液后, 每孔加入用稀释缓冲液 1: 1000 稀释的二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体) 100 μ L, 37℃ 反应 1 h。弃去二抗, 每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次, 在纱布上拍干清洗缓冲液后, 每孔加入显色缓冲液 100 μ L, 当达显色高峰时 (约 10~30 min) 加入 1 mol/L H_2SO_4 100 μ L 终止反应, 在酶标仪上读取 OD450 值。包被抗原 4CCK 融合蛋白在 1: 80 倍稀释 (4CCK 浓度相当于 0.2mg/ml), 阳性血清在 1: 102 时 P/N 值达最大 (表 3), 将此时的抗原抗体的浓度确定为最适工作浓度。

表 3 抗原 (4CCK) 与抗体 (阳性血清) 最佳工作浓度的确定

抗原稀释 倍数	血清稀释倍数					
	1: 10^1	1: 10^2	1: 10^3	1: 10^4	1: 10^5	1: 10^6
1: 10	4.10	4.06	5.07	5.09	3.52	2.03
1: 20	5.58	5.83	3.04	3.74	1.96	2.15
1: 40	4.98	6.07	6.74	4.19	4.03	2.20
1: 80	6.35	9.03	7.91	4.00	2.41	2.28
1: 160	6.36	6.91	4.90	3.59	3.04	1.87
1: 320	5.53	3.72	3.95	3.28	1.19	1.48
1: 640	5.59	3.71	3.58	3.62	2.73	1.58

该方法具有良好的特异性, 用该方法检测未免疫的鸡、鼠、兔血清,

其 P/N 均小于 2。

11 主动免疫 CCK 融合蛋白对肉鸡生产性能的影响

将纯化的融合蛋白 4CCK 制成油乳剂疫苗进行肉鸡免疫实验，疫苗中 4CCK 融合蛋白的含量为 1mg/mL。将 360 只胡须肉鸡饲养至 20 日龄后随机分成 2 组，每组三个重复，每个重复 60 只鸡，1 组为对照组，2 组为 4CCK 免疫组。20 日龄免疫第一次，以后每隔 20 天免疫一次，共免疫 3 次。肉鸡饲养至 90 日龄结束。实验结束时，称重并统计耗料量，计算全期的平均增重、平均采食量和料肉比。结果表明 4CCK 免疫组的体增重明显高于对照组 ($P < 0.05$)，采食量也明显高于对照组 ($P < 0.05$)，料肉比也有所下降，但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 CCK 免疫对鸡生产性能的影响：体重、采食量和料肉比

组别	体增重 (g/只)	采食量 (g/只)	料肉比
对照组	808.64 ± 12.80	3031.62 ± 71.34	3.75 ± 0.03
CCK 免疫组	861.43 ± 23.80	3129.05 ± 45.90	3.63 ± 0.13

12 用 4CCK 融合蛋白免疫肉鸡后血清 CCK 抗体的变化

将纯化的融合蛋白 4CCK 制成油乳剂疫苗进行肉鸡免疫实验，疫苗中 4CCK 融合蛋白的含量为 1mg/mL。将 360 只胡须肉鸡饲养至 20 日龄后随机分成 2 组，每组三个重复，每个重复 60 只鸡，1 组为对照组，2 组为 4CCK 免疫组。20 日龄免疫第一次，以后每隔 20 天免疫一次，共免疫 3 次。肉鸡饲养至 90 日龄结束。分别在 35、55 和 90 天龄时采血，测定血清中 CCK 抗体。

在 96 孔酶标板上，每孔加上用 0.2 mg/ml 4CCK 融合蛋白 100 μ L，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。弃去包被液，每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次，在

纱布上拍干清洗缓冲液后，每孔加入 5% 脱脂奶粉 100 μ L 封闭液，37℃ 封闭 2 h。弃去封闭液，每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次，在纱布上拍干清洗缓冲液，每孔加入最适稀释浓度的一抗 100 μ L，37℃ 反应 1 h。弃去一抗，每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次，在纱布上拍干清洗缓冲液后，每孔加入用 1:1000 稀释的二抗 100 μ L，37℃ 反应 1 h。弃去二抗，每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次，在纱布上拍干清洗缓冲液后，每孔加入显色缓冲液 100 μ L，当达显色高峰时（约 10~30 min）加入 1 mol/L H_2SO_4 100 μ L 终止反应，在酶标仪上读取 OD_{450} 值。用 P/N 表示抗体水平。空白对照组 3 次检测的结果均为 $P/N < 2$ ，且三次的结果变化幅度非常小。而免疫组 3 次检测 P/N 均超过 2，且后两次结果高于第一次（表 4）。

表 4 重组 CCK 免疫后鸡血中 CCK 抗体的 ELISA 检测结果（P/N）

组别	测定日龄（天）		
	35	55	90
对照组	1.350 ± 0.016	1.566 ± 0.045	1.568 ± 0.045
免疫组	2.181 ± 0.137	2.761 ± 0.191	2.675 ± 0.089

序 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学

<120> 缩胆囊素活性片段的串联表达及其应用

<130> 15

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 99

<212> DNA

<213> 缩胆囊素-33 (Cholecystokinin-33, CCK-33)

<220>

<221> cDNA sequence

<222> (1).. (99)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (99)

<400> 1

ggt tct act ggc cgc ttc tct gtc ctt ggc aac cgt gta cag agc att	48
Gly Ser Thr Gly Arg Phe Ser Val Leu Gly Asn Arg Val Gln Ser Ile	
1 5 10 15	

gat ccg acg cac cgt att aat gac cgt gac tac atg ggc tgg atg gat	96
Asp Pro Thr His Arg Ile Asn Asp Arg Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp	
20 25 30	

ttt	99
Phe	

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> 缩胆囊素-33 (Cholecystokinin-33, CCK-33)

序 列 表

<400> 2

Gly Ser Thr Gly Arg Phe Ser Val Leu Gly Asn Arg Val Gln Ser Ile
1 5 10 15

Asp Pro Thr His Arg Ile Asn Asp Arg Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp
20 25 30

Phe

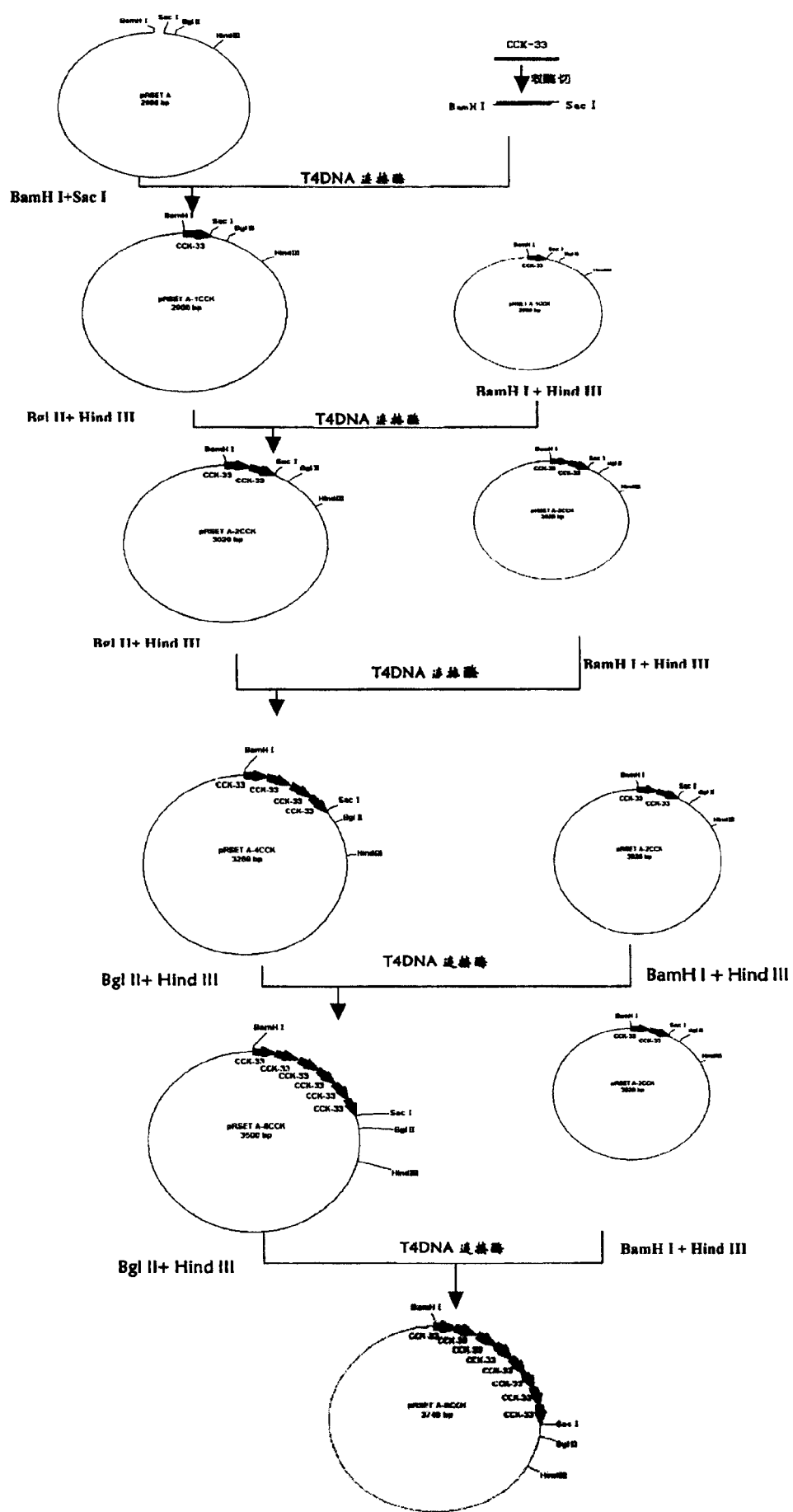


图 1

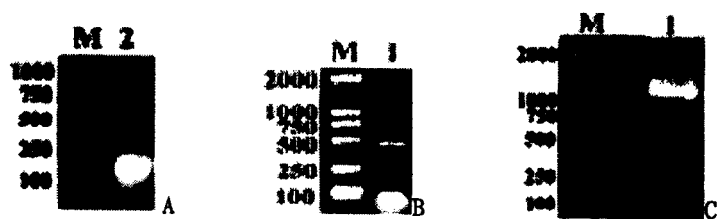


图 2

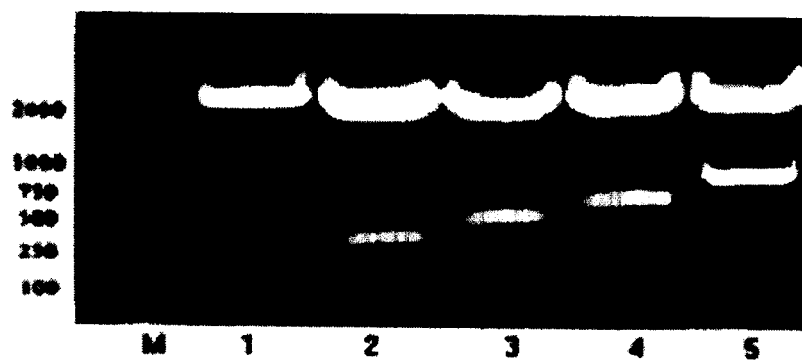


图 3



图 4

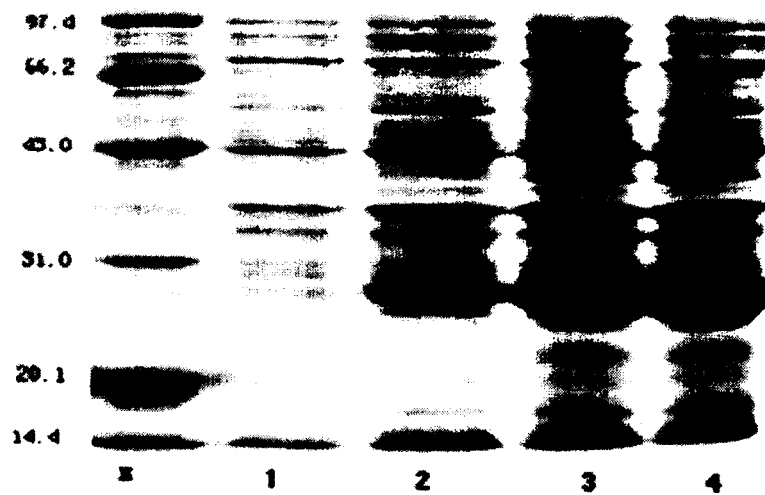


图 5



图 6

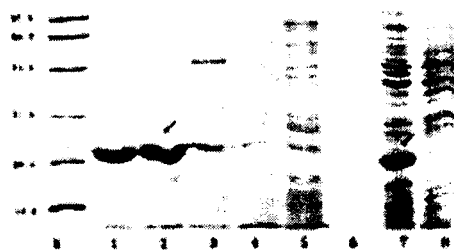


图 7

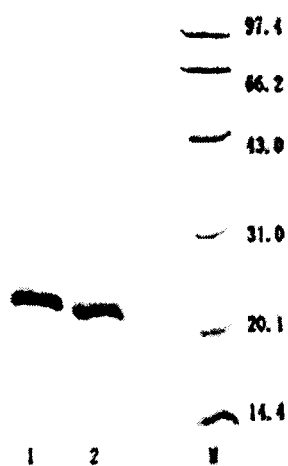


图 8

专利名称(译)	缩胆囊素活性片段的串联表达及其应用		
公开(公告)号	CN1333077C	公开(公告)日	2007-08-22
申请号	CN200510011583.9	申请日	2005-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	曹永长 覃健萍 毕英佐 舒鼎铭 马静云 谢青梅		
发明人	曹永长 覃健萍 毕英佐 舒鼎铭 马静云 谢青梅		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/69 C07K14/465 A61K39/00 C07K16/18 G01N33/53 A23K1/00 A23K1/16 A61P1/00 A23K20/147 A23K50/10 A23K50/30 A23K50/50 A23K50/75		
代理人(译)	向华		
审查员(译)	饶刚		
其他公开文献	CN1687412A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一个获得缩胆囊素活性片段多串联体的方法，包括表达缩胆囊素基因的重组质粒的构建、缩胆囊素基因在大肠杆菌中的表达和缩胆囊素基因工程产物的纯化。表达缩胆囊素基因的重组质粒具有鸡缩胆囊素33基因或其多串联体的核苷酸序列，缩胆囊素基因工程产物具有鸡缩胆囊素33肽或其多串联体的氨基酸残基序列。本发明进一步涉及重组缩胆囊素多肽对动物的主动免疫技术及其应用。

