

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15316

鲤肠道小肽转运载体 PepT1 多克隆抗体的制备及其组织表达分析

闫潇, 杨丽萍, 郑文佳, 孙君君, 卢荣华, 聂国兴

河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007

摘要: 为从蛋白水平研究小肽转运载体(PepT1)在鲤(*Cyprinus carpio* L.)不同组织中的表达及分布规律, 本研究采用 PCR 法获得 *PepT1* cDNA 片段, 并转化至大肠杆菌 Rosetta, 对目标多肽进行原核表达, 将 PepT1 重组蛋白纯化后免疫新西兰长耳兔(*Oryctolagus cuniculus*), 获取兔抗鲤 PepT1 多克隆抗体。采用 ELISA 检测抗体效价, 免疫组化检测 PepT1 的组织表达情况, 并用荧光实时定量 PCR 技术检测 PepT1 转录水平组织表达情况。结果显示, 目标多肽分子量约为 28 kD; 抗体效价达到 4×10^5 。PepT1 在鲤的前肠、中肠、后肠、脾、肝胰脏和肾中均有表达。肠道组织 PepT1 的高表达与其主要完成食物中肽的吸收功能密切相关, 且吸收部位主要集中在前肠和中肠; 肾中 PepT1 免疫染色阳性区域也较为明显, 这与肾小管基底膜存在对短肽的重吸收功能相关。此外, 肝胰脏和脾 PepT1 也有一定的表达, 可能与这两个重要器官代谢旺盛有关。本研究制备的兔抗鲤 PepT1 多克隆抗体能够有效识别鲤各组织中的 PepT1 蛋白, 在后续研究中亦可用于其他鱼类 PepT1 转运蛋白的表达定位和定量研究。

关键词: 鲤; PepT1; 原核表达; 抗体效价; 组织表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0513-09

小肽转运载体 1(peptide transporter, PepT1)可利用向内的 H^+ 电化学梯度和膜电位差推动二肽或三肽等小肽的吸收。PepT1 是小肽家族中研究较多的载体, 在动物体内分布较为广泛, 小肠、肾、胆管和胰腺内均有分布, 主要参与小肽、模拟肽(β 内酰胺抗生素、氨基酸酶)等的吸收、重吸收及转运^[1]。现有研究多集中在畜禽等动物^[2-5], 而对于鱼类的研究则相对较少。1992 年, Verri 等^[6]首次在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)肠道刷状缘膜(brush border membrane, BBM)内发现负跨膜电位的质子积累, 证明其肠道中存在 H^+ /Gly-Gly 协同转运系统。之后, 学者们先后在杂食性鱼类罗非鱼(*Oreochromis* spp.)^[7]和肉食性鱼类岩鱼(*Sebastes caurinus*)以及南极洲无血红蛋白硬骨鱼冰鱼(*Chionodraco hamatus*)^[8]肠道 BBM 中证明同样存在 H^+ /二肽转运系统。Verri 等^[9]于 2003

年完成了斑马鱼(*Danio rerio*) *PepT1* cDNA 的克隆, 经与哺乳动物 PepT1 比对, 发现存在较高的同源性, 验证了鱼类体内亦存在类似转运载体。随后, 在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[10]、欧洲黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[11]、大西洋鳕(*Gadus morhua* L.)^[12]、鲤(*Cyprinus carpio* L.)^[13]、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[14]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[15]体内陆续发现了该基因。

研究者在对斑马鱼^[9]、大西洋鳕^[12]、泥鳅^[10]、欧洲黑鲈^[11]进行 *PepT1* 基因组织表达研究、发育阶段表达及饥饿再投喂分析时, 均采用荧光实时定量 PCR 方法进行检测, 而通过免疫组织化学或 Western blot 等实验检验 PepT1 蛋白水平表达变化的报道较少。其重要原因在于目前鱼类中相应抗体严重匮乏^[16]。本研究以鲤为研究对象, 拟在已经获得的鲤肠道 *PepT1* 基因 cDNA 全长的基

收稿日期: 2015-08-10; 修订日期: 2015-11-13。

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划项目(14IRTSTHN013)。

作者简介: 闫潇(1986–), 助教, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: yanxiao1209@163.com

通信作者: 聂国兴, 教授。E-mail: niegx@htu.cn

础上^[17], 表达 PepT1 重组蛋白, 以其为抗原制备 PepT1 特异性抗体, 采用免疫组化和荧光实时定量 PCR 技术检测 PepT1 在鲤不同组织中的表达情况, 这为从分子水平和蛋白水平研究 PepT1 结构与功能的关系以及鱼类肠道蛋白的代谢和小肽的吸收奠定基础。

1 材料与方法

1.1 目的基因的克隆、鉴定以及重组质粒 pMDTM19-T-PepT1 (198 bp) 的构建

基于本实验室已获得的鲤肠道 *PepT1* 基因的全长序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计 1 对特异性引物(上游引物 *PepT1*-F1: 5'-GCAGCCTCAGTCAAAGCA-3', 下游引物 *PepT1*-R1: 5'-ACAGCCACCAGGAGACAT-3')。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

Trizol 法提取鲤前肠组织总 RNA, 按试剂盒反转录合成 cDNA。以此 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到全长序列。反应条件为: 95℃ 3 min; 94℃ 40 s, 53.5℃ 50 s, 72℃ 2 min 15 s, 32 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

使用 UNIQ-10 通用快速/纯化试剂盒(生工生物工程股份有限公司, 上海)回收琼脂糖凝胶中的 DNA 全长序列。将回收产物与 pGEM-T 载体(PROMEGA 公司, 北京)连接过夜, 转化到感受态细胞 *E.coli* JM109 中。蓝白斑筛选阳性克隆后进行菌液 PCR 验证, 测序鉴定。

根据 *PepT1* 基因的开放阅读框序列, 采用在线软件(BepiPred 1.0)预测其具有免疫原性的片段, 选取其中位于胞外环上的具有免疫原性的片段(393~458 aa), 该片段为 *PepT1* (198 bp), 其核酸序列如下:

5'-ACAGTCCCCAACTTCCCATCAAGCTCTCAAACCCAGGTGAAGTTCCTGAACTTGGAGAACACACCAGTGCCTGTTGTAGTGGAGGGGCAAGAACCGTTTGTGTTTCTGGTTTAAATTCCTCTAATAATTATATGACACTGGACACTGAGAACGTTACGGTCTCTGCTGGAGGAAGAGACGCTACAGCTTACTTCCAG-3'

利用 Primer Premier 5.0 设计 1 对特异性引物(含 *Bam*H I 及 *Eco*R I 双酶切位点):

PepT1-F2: 5'-CGGGATCCACAGTCCCCAAC-3' (*Bam*H I)

PepT1-R2: 5'-CGGAATTCTCACTGGAAGTAAGCTG-3' (*Eco*R I)

划线部分分别为 *Bam*H I 及 *Eco*R I 的酶切位点。

采用 *PepT1*-F2 和 *PepT1*-R2 引物, 将 *Bam*H I 及 *Eco*R I 双酶切位点克隆至 pGEM-T-*PepT1* 质粒, 25 μL 反应体系为: cDNA 2.5 μL, *PepT1*-F1 1 μL, *PepT1*-R1 1 μL, dNTP Mix 1 μL, 10×*Taq* Plus DNA 聚合酶 Buffer 2.5 μL, *Taq* Plus DNA 聚合酶 0.3 μL, ddH₂O 16.7 μL。反应条件为 94℃ 3 min, 94℃ 50 s, 52.4℃ 50 s, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。*Bam*H I、*Eco*R I、PCR Amplification Kit 均购自大连宝生物公司。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收, 将回收产物与 pMDTM19-T 载体连接过夜, 转化到感受态细胞 *E.coli* JM109 中。选取阳性克隆菌株扩大培养, 用 Plasmid Mini Kit I 质粒提取试剂盒(OMEGA 公司, 美国)提取 pMDTM19-T-*PepT1* (198 bp) 重组质粒。

1.2 原核表达载体 pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp) 的构建及鉴定

将阳性克隆 pMDTM19-T-*PepT1* (198 bp) 与载体质粒 pET-32a(+) 分别用 *Bam*H I、*Eco*R I, 37℃ 双酶切, 回收 *PepT1* (198 bp) 目的片段和载体, 二者定向连接并转化到 *E.coli* Rosetta 中, 提取重组质粒进行单双酶切, 确定构建表达质粒的正确性。

1.3 pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp) 重组蛋白诱导表达及鉴定

将重组菌按体积比 1 : 100 接种于含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37℃, 200 r/min 扩大培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 时, 加入终浓度 1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG), 37℃, 200 r/min 振荡诱导培养 8~10 h 后 5000 r/min 离心 3 min, 收集菌体, 加适量 ddH₂O, 与 2×上样缓冲液 1 : 1 在 1.5 mL Eppendorf 管中混匀。沸水浴 10 min, 5000 r/min 离心 30 s。取 35 μL 上清, 以未经

IPTG 诱导的对照菌体样品和诱导的含有空载体 pET-32a(+)表达菌体为对照, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

电泳结束后将分离胶放于 0.3 mol/L KCl 里染色几分钟, 显示目的条带。切下胶上的目的蛋白条带, 放入 ddH₂O 里清洗。将胶条剪碎放入塑料培养皿中, 冷冻干燥(1 d), 放入研钵中磨成粉末, 每 200 mg 目的蛋白粉加 3 mL 生理盐水溶解蛋白, 离心, 取上清, 用超微量分光光度计检测蛋白浓度。

1.4 表达产物多克隆抗体的制备及抗体效价的测定

用生理盐水获得的蛋白溶液稀释到一定浓度(约 400 μg/mL), 免疫动物选用新西兰长耳兔(约 3 kg)。第 1、2 次用完全弗氏佐剂(SIGMA 公司, 德国), 每只兔子加抗原 300 μg, 进行耳缘静脉注射, 第 3、4 次用不完全弗氏佐剂(SIGMA 公司, 德国), 每只兔子加抗原 200 μg, 进行皮下多点注射。第 4 次免疫 8 d 后颈动脉采血(兔在采血前禁食 1 d)。收集于经灭菌并不含抗凝剂的离心管中, 室温放置 2 h, 放 4℃ 过夜, 析出淡黄色抗血清, 进行冷冻干燥保存, 部分放于 4℃ 备用。

利用 ELISA, 取 PepT1 融合蛋白作为包被抗原, 1%牛血清白蛋白、0.1% Tween20 的 PBS 为封闭液, 免疫获得的兔抗血清为一抗, 羊抗兔 IgG-HRP (HRP conjugated)为二抗, 酶标仪(Thermo)测定抗血清效价。同时, 设立空白对照(只加包被缓冲液)和阴性对照(对照组未免疫兔血清), 在 450 nm 下读取吸光度值。抗体效价判定方法: 处理组/阴性对照组的光吸收比值≥2.0 时, 抗血清的最大稀释倍数为待测抗血清的效价。

1.5 PepT1 组织表达的免疫组化检测

选取同规格鲤 6 条, 平均体重(80.0±0.5) g, 禁食 24 h 后, 无菌条件下分离前肠、中肠、后肠、脾、肝胰脏、肾等 6 个组织, 用液氮速冻后转移至-80℃冰箱中保存, 用于分析 PepT1 组织表达。

采用石蜡包埋法包埋鲤的前肠、中肠、后肠、肝胰脏、脾和肾等 6 个组织, 以约 5 μm 厚度进行切片。1%的蛋清展片后, 进行脱蜡复水、免疫组织化学染色(内源性过氧化物酶阻断、羊血清封闭、一抗孵化、二抗孵化、DAB 显色、终止)、苏木精复染、脱水透明及树胶封片。阴性对照以 PBS 代替一抗。采用 Zeiss 荧光显微镜自动成像系统进行观察、拍照。

1.6 PepT1 组织表达的荧光实时定量 PCR 检测

根据荧光定量试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ II, 宝生物公司, 大连)的要求, 使用在线软件 PrimerQuest, 以鲤 *PepT1* 基因(GenBank 登录号: AEX13747.1)作为模板设计本实验所用鲤 *PepT1* 基因荧光定量特异性引物, 并以鲤 β -actin 基因(GenBank 登录号: JQ619775.1)为模板设计内参基因 β -actin 荧光定量特异性引物(表 1)。

Trizol 法提取前肠、中肠、后肠、脾、肝胰脏和肾等 6 个组织 RNA, 反转录合成 cDNA, 以其为模板, 采用 *PepT1*-F3 和 *PepT1*-R3 引物进行扩增。反应条件为 95℃ 3 min; 94℃ 30 s, 53.5℃ 50 s, 72℃ 2 min, 33 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。1.0%琼脂糖凝胶电泳验证, 阳性克隆送至上海英骏公司测序。测序结果与已知序列进行比对, 如一致, 则说明引物正确。荧光实时定量 PCR 检测 *PepT1* 组织表达情况, 反应体系为 20 μL。

表 1 鲤 *PepT1* 荧光定量引物参数
Tab. 1 Parameters of q-PCR primer pairs of *PepT1*

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	产物/bp product
<i>PepT1</i>	<i>PepT1</i> -F3: AATGCTGGCAGTCTTCTCTCCACT	144
	<i>PepT1</i> -R3: TGCGATGAACACAATGAGGGCAAC	144
β -actin	Actin+: GACTTCGAGCAGGAGATGG	138
	Actin-: CAAGAAGGATGGCTGGAACA	138

反应结束后进行熔解曲线分析, 确定反应物无非特异性扩增, 并用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进一

步确认。得到并记录 C_T 值, 然后再根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(C_{T\text{目的基因}}-C_{T\text{管家基因}})}$, 计算出各个处理

组鲤 *PepT1* mRNA 与内参基因 β -actin 的相对表达丰度。采用 SPSS18.0 for windows 进行 one-way ANOVA 分析和 LSD 比较。结果以平均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 *PepT1* 抗原决定簇目的片段的克隆

提取鲤鱼前肠总 RNA, 经 RT-PCR 获得了 *PepT1* 全长 cDNA 序列, 以其为模板, 利用 *PepT1*-F 和 *PepT1*-R 引物扩增得到 1 条 198 bp 的特异性条带(图 1)。

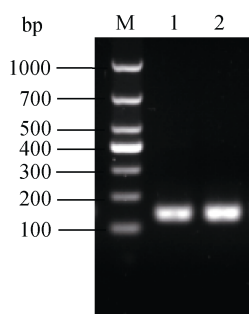


图 1 鲤 *PepT1* 抗原决定簇片段 PCR 扩增产物的电泳图
1, 2: *PepT1* 抗原决定簇区域 PCR 产物; M: 2000 bp DNA ladder.

Fig. 1 Gel electrophoresis pattern of *PepT1* PCR product
Lane 1 and 2: *PepT1* PCR product; M: 2000 bp DNA ladder.

2.2 重组质粒 pET-32a(+)-*PepT1*(198 bp)的构建及酶切鉴定

将目的片段 *PepT1* (198 bp) 连接至平末端载体 pMDTM19-T Vector 上, 得到 pMDTM19-T-*PepT1* (198bp)重组质粒。将 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切测序正确的质粒, 构建到原核表达载体 pET-32a(+)上, 得到重组表达质粒 pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp)。对该重组质粒进行 *Bam*H I 单酶切及 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切(图 2), 1%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。单酶切可见有约 6000 bp 的条带(1 号泳道), 双酶切获得 6000 bp 大小的载体条带和 198 bp 目的条带(2 号泳道), 表明目的条带 *PepT1* 已正确连接到 pET-32a(+)载体上, pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp) 表达载体构建成功。

2.3 融合蛋白的表达及鉴定

以未经 IPTG 诱导的 pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp)

菌液和含空载体 pET-32a(+)的菌液为阴性对照, 用 IPTG 诱导表达 pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp)大肠杆菌 Rosetta 菌液, 通过 SDS-PAGE 电泳分析发现, 处理组较对照组出现一条分子量大小约为 28 kD 的特异性条带(图 3)。

2.4 *PepT1* 抗体效价测定结果

根据不同稀释倍数下 *PepT1* 抗体 OD 值(表 2),

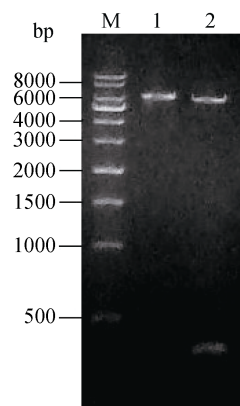


图 2 pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp)重组表达质粒的电泳分析

1: pET-32a(+)-*PepT1*(198 bp)单酶切; 2: pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp)双酶切; M: 1 kb DNA ladder.

Fig. 2 Electrophoresis analysis of pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp) recombinant plasmid

Lane 1: single digest of pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp); Lane 2: double digest of pET-32a(+)-*PepT1* (198 bp); M: 1 kb DNA ladder.

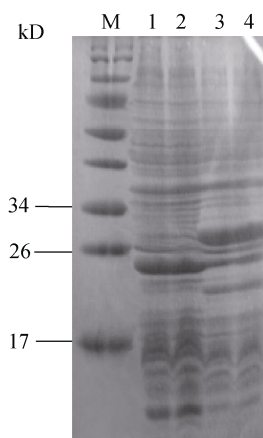


图 3 重组 *PepT1* SDS-PAGE 图谱

1: 空质粒 pET32a(+)转化 *E.coli* Rosetta 对照组; 2: 未经 IPTG 诱导的表达组; 3、4: 经 IPTG 诱导的表达组; M: 低分子重量蛋白 marker.

Fig. 3 SDS-PAGE pattern for the recombinant *PepT1*
Lane 1: *E.coli* Rosetta with pET32a(+); 2: *E.coli* Rosetta without IPTG induction. 3, 4: *E.coli* Rosetta induced by IPTG; M: protein molecular weight marker (low).

表 2 ELISA 测定 PepT1 抗体效价
Tab. 2 Antibody titer of PepT1 by ELISA

项目 item	序号 order number							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution	1.0×10^2	1.0×10^3	1.0×10^4	1.0×10^5	2.0×10^5	4.0×10^5	8.0×10^5	1.6×10^5
处理组 treatment	1.1086	1.1153	0.8378	0.5302	0.3731	0.2380	0.1075	0.0987
阴性对照 negative control	0.1420	0.1025	0.0834	0.0800	0.0813	0.0856	0.0628	0.0760
空白对照 blank control	0.0513	0.0520	0.0510	0.0518	0.0520	0.0521	0.0517	0.0515
处理组/对照组 treatment/negative control	7.81	10.88	10.05	6.63	4.59	2.78	1.71	1.30

计算处理组/阴性对照组的光吸收比值, 当稀释倍数达到 4×10^5 时, 比值为 2.78, 在稀释至 8.0×10^5 倍数下, 比值为 1.71。因此, 判定 PepT1 抗血清的效价为 4×10^5 。

2.5 PepT1 在鲤不同组织中的表达分析

利用制备的 PepT1 多克隆抗体, 采用免疫组织化学方法, 观察 PepT1 蛋白在鲤前肠、中肠、后肠、肝胰脏、脾和肾中的表达情况。肠道组织的实验结果见图 4。阳性染色呈现棕黄色, 且从刷状缘绒毛基部到顶部逐渐加强, 主要位于中部和尖端。PepT1 蛋白在鲤前肠和中肠刷状缘上阳性染色明显, 后肠刷状缘阳性染色较浅且稀疏; 在脾、肝胰脏和肾中也可观察到阳性染色见图 5。肝胰脏、脾、肾中阳性染色液同样呈现棕黄色, 其中, 肾的阳性颜色在近端小管刷状缘膜上有广泛分布。

利用荧光实时定量 PCR 检测 *PepT1* 在鲤各组织中的表达情况, 结果显示: *PepT1* 在鲤前肠、中肠、后肠、脾、肾和肝胰脏中均有表达。在前肠中表达量最高($P<0.05$), 其次是中肠($P<0.05$), 在脾中表达量最少(图 6)。

3 讨论

抗体具有较高的选择性和亲和性, 可识别不同结构, 是营养生理学研究免疫组化、Western blot 分析的一种重要工具。对于高通量的抗体制备而言, 抗原的获得是其中关键的限速步骤。现阶段抗原的获得方法有以下几种: (1) 抗原提取剂。孙盛明等^[18]从青虾血淋巴中离心得到青虾血蓝蛋白, 经纯化后免疫家兔制备了多克隆抗体。(2) 人工合成的多肽。主要有液相法、固相法和酶促合成法。李驰峻等^[19]用固相法合成由 12

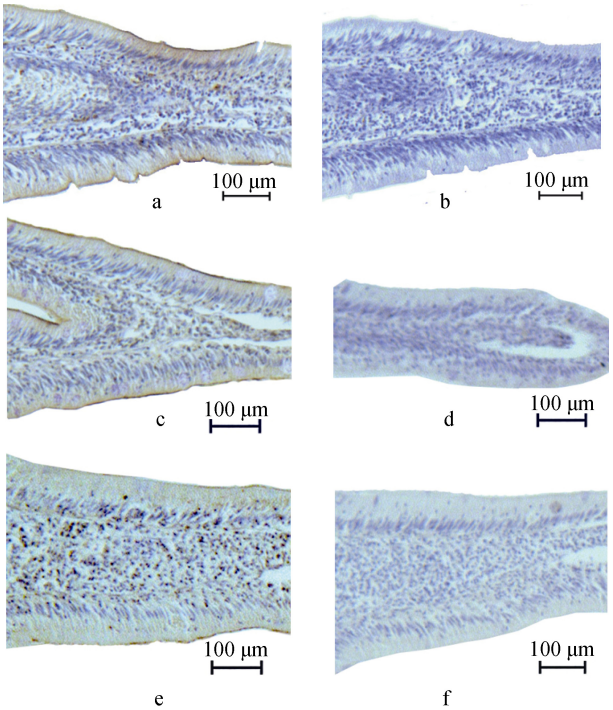


图 4 鲤前肠、中肠、后肠 PepT1 表达的免疫组织化学检测结果

a、c、e 分别代表前肠、中肠和后肠免疫阳性染色; b、d、f 分别代表前肠、中肠、后肠的阴性对照染色。

Fig. 4 Immunohistochemistry detection of PepT1 in proximal intestine, middle intestine and distal intestine of *Cyprinus Carpio* L. a, c, e: the positive staining in proximal intestine, middle intestine and distal intestine, respectively; b, d, f: negative control staining of proximal intestine, middle intestine and distal intestine by omitting primary antibody.

个氨基酸残基组成的多肽, 免疫家兔制备抗体, 研究绿豆抗氰呼吸与交替氧化酶表达关系。(3) 基因工程抗原。基因工程抗原一般分原核表达和真核表达, 一般是将想要表达的抗原插入表达载体(如 pET 表达载体)中, 导入工程菌如大肠杆菌 BL21 等, 通过大量的表达获得大量的抗原, 韩凌霞

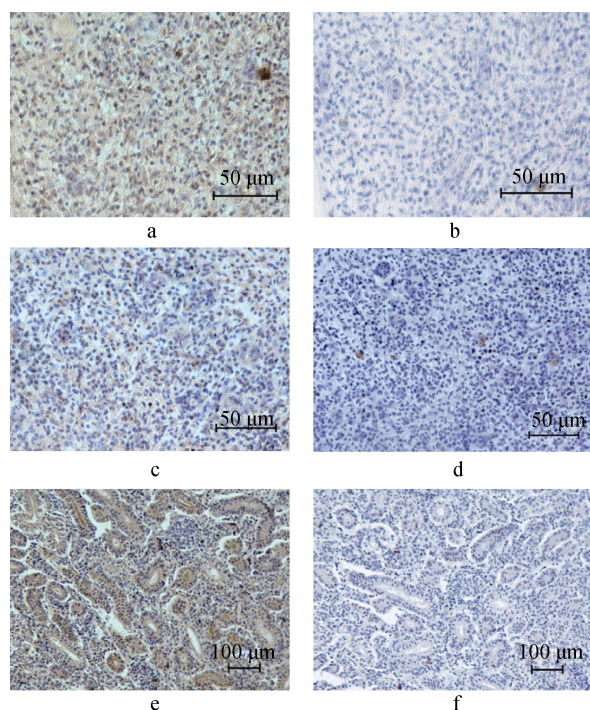


图 5 鲤肝胰脏、脾、肾 PepT1 表达的免疫组织化学检测结果

a, c, e 分别代表肝胰脏、脾、肾免疫阳性染色; b, d, f 分别代表肝胰脏、脾、肾的阴性对照染色。

Fig. 5 Immunohistochemistry detection of PepT1 in liver, spleen and kidney of *Cyprinus Carpio* L.

a, c, e: the positive staining in liver, spleen and kidney tissues, respectively; b, d, f: negative control staining of liver, spleen and kidney tissues by omitting primary antibody.

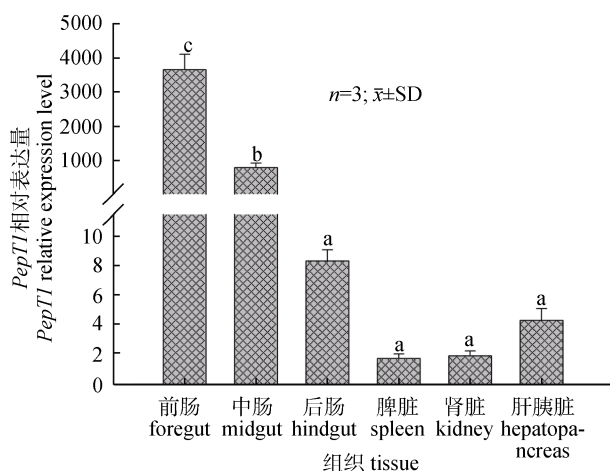


图 6 各组织 *PepT1* mRNA 的相对表达量
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 The circadian rhythm on the relative abundance *PepT1* mRNA in foregut, midgut, hindgut, spleen, kidney, and hepatopancreas of *Cyprinus carpio* L.

Different letters of the same tissue indicate difference at 0.05 level among treatments.

等^[20]以重组质粒 pGEM-MDgI 在大肠杆菌 BL21 中表达马利克氏病病毒特超强毒 648A 株的囊膜糖蛋白 I(gI) 完整基因, 免疫小鼠制备单克隆抗体。杨晓冰等^[21]将家蚕细胞自噬相关蛋白 Bm ATG8 的 354 bp 编码区序列连入 pET32a(+) 质粒中并转化 *E. coli* Rosseta 菌株, 继而诱导表达重组 Bm ATG8 蛋白, 免疫新西兰大白兔获得多克隆抗血清。

本研究中采用基因工程制备抗原, 由于鲤 PepT1 属于典型的跨膜蛋白, 组织含量低且具有 12 个跨膜域, 所以不能有效地进行分离纯化, 体外表达大量具有生物活性的 PepT1 全长抗原蛋白也具有一定难度, 这成了制备 PepT1 抗体的技术瓶颈。本实验在 PepT1 全长基因上选取了一段具有免疫原性长度为 198 bp 的片段, 构建到表达载体 pET-32a(+) 上, 得到重组表达质粒, 通过大肠杆菌离体表达系统体外表达出大小约为 28 kD 的融合蛋白, 成功制备了特异性强、效价高的 PepT1 抗体。同时, 鲤 PepT1 氨基酸序列和斑马鱼的相似性最高达 80.9%^[13], 表明 PepT1 具有较高的保守性。因此本实验制备的 PepT1 抗体亦可用于其他鱼类 PepT1 的表达研究。同时, 本实验用包含抗原决定簇的小肽片段替代完整蛋白质抗原, 成功制备了能够识别完整蛋白的抗体, 因此, 这一基于抗原决定簇的抗体制备技术为一些难以获得足量抗原的抗体制备提供了一种可选方案, 也可以为其他功能性蛋白的性质和表达研究提供思路。

本研究中免疫组化染色结果显示鲤 PepT1 蛋白在前肠和中肠阳性染色较后肠明显, 且石斑鱼研究结果显示, PepT1 蛋白主要存在于肠道 BBM, 阳性染色沿着小肠绒毛从基部到顶部逐渐加强, 主要位于绒毛的中部和尖端^[22]。这与本研究结果相一致。除肠道存在 PepT1 蛋白表达外, 脾、肝胰脏和肾中也呈现阳性染色。表明鲤肠道对小肽的吸收主要集中在前肠和中肠, 提示前肠和中肠是小肽吸收的主要部位。肠道是最大的消化器官, 也是蛋白代谢的主要场所, 不断地进行着蛋白质、氨基酸和肽类的转运活动。而在脾、肝胰脏和肾中也有表达, 笔者认为这 3 种组织代谢旺盛

的器官, 所以 PepT1 可能参与这些组织对小肽的转运。由此可见, PepT1 蛋白的组织表达和功能有密切关系。进一步通过实时定量 PCR 对 *PepT1* 基因相对表达量进行了检测, 发现与蛋白表达情况一致。肠道中 *PepT1* 的相对表达量高于脾、肾、肝胰脏。其中, 前肠 *PepT1* 的相对表达量最高, 中肠次之, 后肠最低, 其余组织中 *PepT1* 的相对表达量更低。这种表达模式与草鱼^[15]、岩原鲤 (*Procypris rabaudi*)^[23] 和鲫 (*Carassius auratus*)^[24] *PepT1* 的组织表达的研究结果相似。

综上所述, 作为小肽转运载体, 鱼类中 PepT1 主要在肠道中表达, 尤其是前肠和中肠, 后肠表达量较低, 我们推测这可能与 PepT1 的结构和功能相关, 有可能是 PepT1 载体的低亲和力/高容量特性使然, 使小肽的吸收很高效, 在肠道前段就已基本吸收完全^[25], 为肠道不同部位吸收蛋白质的强度不同提供了理论依据。探讨 PepT1 蛋白的组织表达定位为阐明鲤机体组织对小肽的转运吸收机制奠定了基础, 该结果为更好地分析小肽的利用和吸收规律奠定了基础。

参考文献:

- [1] Rubio-Aliaga I, Daniel H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery[J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(9): 434-440.
- [2] Agar W T, Hird F J, Sidhu G S. The active absorption of amino-acids by the intestine[J]. J Physiol, 1953, 121(2): 255-263.
- [3] Hara H, Funabiki R, Iwata M, et al. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions[J]. J Nutr, 1984, 114(6): 1122-1129.
- [4] Zhou L, Cao G T, Zhang S, et al. Intestinal fatty acid binding protein and dipeptide transporter 1 mRNA in the small intestinal mucosa of weaner piglets: developmental expression and influence of glutamine[J]. China Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(4): 704-711.[周琳, 曹广添, 张帅, 等. 断奶仔猪小肠黏膜脂肪酸结合蛋白和二肽转运载体 1mRNA 表达发育性变化及谷氨酰胺对其的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(4): 704-711.]
- [5] Zhang A H, Zhang S, Cai H Y, et al. Regional and ontogenetic expression of PepT1, B⁰AT and EAAT3 mRNA in intestine of Arbor Acre Broilers[J]. China Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(9): 2841-2850.[张爱华, 张姝, 蔡辉益, 等. 爱拔益加肉仔鸡肠道 *PepT1*、B⁰AT 和 *EAAT3* mRNA 的表达差异与发育规律[J]. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2841-2850.]
- [6] Verri T, Maffia M, Storelli C. H⁺/glycyl-glycine cotransport in eel intestinal brush-border membrane vesicles: studies with the pH-sensitive dye Acridine orange[J]. Biochim Biophys Acta (BBA), 1992, 1110: 123-126.
- [7] Thamotharan M, Gomme J, Zonno V, et al. Electrogenic, proton- coupled, intestinal dipeptide transport in herbivorous and carnivorous teleosts[J]. Am J Physiol, 1996, 270: R939-947.
- [8] Maffia M, Rizzello A, Acierno R, et al. Characterisation of intestinal peptide transporter of the Antarctic haemoglobinless teleost *Chionodraco hamatus*[J]. J Exp Biol, 2003, 206: 705-714.
- [9] Verri T, Kottra G, Romano A, et al. Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter[J]. FEBS Lett, 2003, 549: 115-122.
- [10] Gonçalves A F, Castro L F C, Pereira-Wilson C. Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish?[J]. Comp Biochem Physiol D, 2007, 2(4): 345-355.
- [11] Terova G, Corà S, Verri T, et al. Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquaculture, 2009, 294: 288-299.
- [12] Ronnestad I, Gavaia P J, Viegas C S, et al. Oligopeptide transporter PepT1 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): cloning, tissue expression and comparative aspects[J]. J Exp Biol, 2007, 210: 3883-3896.
- [13] Ostaszewska T, Dabrowski K, Grochowski P, et al. The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Comp Biochem Physiol A, 2010, 157: 158-169.
- [14] Liu Z X, Zhang J D, Liu X Y, et al. Molecular characterization and expression research of oligopeptide transporter *pept1* in *Siniperca chuatsi*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(3): 556-562.[刘知行, 张建东, 刘小燕, 等. 鳊小肽转运载体 PepT1 基因分子特征及其表达研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 556-562.]
- [15] Feng J C, Liu Z, Lu S Q, et al. Cloning of the *Pept1* gene and analysis of its expression in *Ctenopharyngodon idellus* tissues[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 276-285.[冯军厂, 刘臻, 鲁双庆, 等. 草鱼小肽转运载体 *PepT1* 基因的克隆与表达特征[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 276-285.]
- [16] Romano A, Barca A, Storelli C, et al. Teleost fish models in

- membrane transport research: the PEPT1(SLC15A1) H^+ -oligopeptide transporter as a case study[J]. *J Physiol*, 2013, 592(5): 1–17.
- [17] Nie G X, Yan X, Wang J L, et al. Peptide transporter Pept1 in *Cyprinus carpio* L.'s intestine: cDNA cloning and sequence analysis[J]. *Turk J Biochem*, 2012, 37: 204–211.
- [18] Sun S M, Ge X P, Fu H T, et al. Molecular cloning and expression analysis of the hemocyanin gene from oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 235–243.[孙盛明, 戈贤平, 傅洪拓, 等. 青虾血蓝蛋白基因的克隆、表达分析及多克隆抗体的制备[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(2): 235–243.]
- [19] Li C J, Liang H G, Du L F, et al. Studies on the relationship between cyanide-resistant respiration and expression of alternative oxidase in mung bean using antibodies prepared by synthetic polypeptide[J]. *Science in China: Series C*, 2005, 31(1): 66–70.[李驰峻, 梁厚果, 杜林方, 等. 用合成多肽制备抗体研究绿豆抗氰呼吸与交替氧化酶表达关系[J]. *中国科学: C 辑*, 2005, 31(1): 66–70.]
- [20] Han L X, Chen L, Ding J B, et al. Preparation of monoclonal antibodies specific for MDV glycoprotein I expressed in *Escherichia coli*[J]. *Jiangsu Agricultural Research*, 2001, 22(2): 54–57, 62.[韩凌霞, 陈雷, 丁家波, 等. 马立克氏病病毒囊膜糖蛋白 原核表达产物单克隆抗体的制备[J]. *江苏农业研究*, 2001, 22(2): 54–57, 62.]
- [21] Yang X B, Li H J, Wu Y P, et al. Preparation of polyclonal antibody and tissue expression analysis of BmATG8 in Silkworm (*Bombyx mori*)[J]. *Science of Sericulture*, 2014, 40(5): 818–823.[杨晓冰, 李洪建, 吴永鹏, 等. 家蚕细胞自噬相关蛋白 Bm ATG8 的多克隆抗体制备与组织表达分析[J]. *蚕业科学*, 2014, 40(5): 818–823.]
- [22] Yuen B B H, Wong C K C, Woo N Y S, et al. Induction and recovery of morpho functional changes in the intestine of juvenile carnivorous fish (*Epinephelus coioides*) upon exposure to foodborne benzo[a]pyrene[J]. *Aquat Toxicol*, 2007, 82: 181–194.
- [23] Ye W L. PepT1 tissue expression and impact of hunger as well as soy oligopeptides on PepT1 mRNA expression levels in *Procypris rabaudi* (Tchang)[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2010: 1–60.[叶万里. 岩原鲤 型小肽转运载体 PepT1 组织表达及饥饿与大豆低聚肽对其 mRNA 的影响[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2010: 1–60.]
- [24] Xiong G. Cloning and abundance of crucian LAT2 and PePT1 gene[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2009: 1–67.[熊刚. 鲫鱼 LAT2 和 PEPT1 基因克隆、序列分析及组织表达研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009: 1–67.]
- [25] Xiao J H, Wu Y P, He Y, et al. Differential expression of PepT1 mRNA in small intestine of Chongren Spotty Chicken[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(2): 191–196.[肖金华, 武艳平, 何余, 等. 崇仁麻鸡小肠 PepT1mRNA 基因差异表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(2): 191–196.]

Preparation of the antibody and tissue distribution of the peptide transporter PepT1 in *Cyprinus carpio* L.

YAN Xiao, YANG Liping, ZHENG Wenjia, SUN Junjun, LU Ronghua, NIE Guoxing

College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: The lack of a PepT1 antibody for fish has hindered analysis of PepT1 protein expression by immune tissue chemistry or western blot. We analyzed the expression and distribution of PepT1 in *Cyprinus carpio* L. at the transcriptional and protein levels. The immunogenic cDNA of PepT1 was obtained by PCR and the fragments were inserted into a pET-32a (+) Vector and transformed into *Escherichia coli* Rosetta. The target polypeptide was expressed after induction with 1% IPTG. The molecular weight of the recombinant protein was measured by SDS-PAGE electrophoresis. The purified PepT1 recombinant protein was used to immunize New Zealand long-eared rabbits by ear vein injection combined with subcutaneous injection for 38 d to obtain rabbit anti carp PepT1 polyclonal antibody. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) was used to evaluate the antibody titers, immunohistochemistry was used to check the tissue expression of PepT1, and real-time fluorescent quantitative PCR was used to evaluate the expression of PepT1 at the transcriptional level. The molecular weight of the target polypeptide was ~28 kDa, and the antibody titer was 4×10^5 , suggesting that activity was high. The PepT1 protein was expressed in the foregut, midgut, hindgut, spleen, hepatopancreas, and kidneys. The level of expression was remarkably higher in the foregut and midgut than in other tissues, which may be due to their roles in absorption of peptides during digestion. The positive immune staining region in the renal tissue was obvious and clear, and consistent with short peptides being re-absorbed by PepT1 distributed on the renal tubular basement membrane. Additionally, the PepT1 transporter was also expressed in the hepatopancreas and spleen, both metabolically active tissues in carp. In conclusion, the rabbit anti-carp PepT1 polyclonal antibody prepared in this study can effectively identify PepT1 from different tissues of carp. The expression pattern of PepT1 is similar to that at the transcriptional level. Our results provide a foundation for study of the structure and function of PepT1 at both the molecular and protein levels in carp. Additionally, we provide a basis for analysis of the relationship between small peptide absorption and protein metabolism. The antibody described here will be an important tool for localization and quantitative research of PepT1 in related fish such as *Carassius auratus*, *Ctenopharyngodon idellus*, that belong to the family Cyprinidae or even in Cypriniformes.

Key words: *Cyprinus carpio* L.; prokaryotic expression; antibody titer; tissue distribution

Corresponding author: NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn