

双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 抗体的制备及其表达分布

白兆星 么宏强 罗雨晨 张雅文 张光杰 斯日古楞*

内蒙古农业大学兽医学院, 农业部动物疾病临床诊疗技术重点实验室 呼和浩特 010000

摘要: 双峰驼 (*Camelus bactrianus*) 经过长期的自然选择, 具备了许多特殊的生物学特性, 比如极强的耐渴、耐饥饿以及适应恶劣气候等能力。Nesfatin-1 是一种由 82 个氨基酸组成的肽, 通过其前体物质 NUCB2 在 Lys 83 ~ Arg 84 位点的前激素转化酶 (PCs) 的蛋白质水解而来, 其可以调节机体的能量代谢效率, 对食欲有抑制作用。研究双峰驼体内 NUCB2/Nesfatin-1 的分布与表达, 以探究双峰驼体内是否具有特有的能量代谢方式, 是否与其不会发生代谢性疾病有一定的联系。使用化学合成的方法合成双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位的半抗原多肽, 使用马来酰亚胺法将半抗原与血蓝蛋白 (KLH) 偶联, 通过免疫动物制备针对 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白单一抗原表位的多克隆抗体, 应用 Western Blot 方法检测 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在双峰驼下丘脑 (弓状核、孤束核、腹内侧核)、前峰脂肪、后峰脂肪、胃 (胃底腺周围组织)、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、胰腺、肝以及腹部脂肪组织中的表达情况, 使用荧光定量 PCR 技术检测 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 在双峰驼上述组织中的表达情况。结果采用 GraphPad Prism 5.0 软件的 *t* 检验分析。合成的双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽杂峰很少, 经过计算其纯度大于 95%。多肽的质荷比 $[M + 4H]^{4+}$ 和 $[M + 3H]^{3+}$ 符合预期。经过间接 ELISA 法测定制备的针对 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的多克隆抗体的效价为 5.12×10^5 , 成功制备多克隆抗体。使用制备的 NUCB2/Nesfatin-1 多克隆抗体检测双峰驼体内的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的分布, 其中, 在双峰驼脂肪组织和胰腺组织中表达较为显著。荧光定量 PCR 检测双峰驼体内的 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 的分布, 在所检测的组织中均有基因表达, 其中, 在腹部脂肪和肝组织的相对表达量较高。本研究通过分析抗原表位及合成多肽的方式, 成功制备了针对双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的特异性抗体, 且该抗体的效价高、特异性强。通过成功制备的特异性抗体在蛋白层次上检测 NUCB2/Nesfatin-1 在双峰驼体内的分布情况, 再使用荧光定量 PCR 方法在基因层次检测 NUCB2/Nesfatin-1 在双峰驼体内的分布情况。通过对结果的分析后发现, NUCB2/Nesfatin-1 可能在双峰驼的耐渴、耐饥饿的机制调节中起到了抑制食欲的作用, 使得双峰驼可以忍受长时间的饥饿, 在双峰驼的外周脂肪组织中高表达, 推测 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在双峰驼体内可能通过抑制脂肪细胞的分化, 促进脂肪细胞中脂滴的水解为机体提供能量, 其具体在脂肪细胞中的功能有待我们的进一步研究。

关键词: Nesfatin-1; 多克隆抗体; 双峰驼; 组织分布

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 03-401-11

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31860693, 32160821) ;

* 通讯作者, E-mail: srgl_imau@163.com;

第一作者简介 白兆星, 男, 硕士研究生; 研究方向: 兽医生理与病理学; E-mail: 948970897@qq.com。

收稿日期: 2021-11-02, 修回日期: 2022-03-09 DOI: 10.13859/j.cjz.202203009

Antibody Preparation and Expression Distribution of NUCB2/Nesfatin-1 in Bactrian Camel

BAI Zhao-Xing YAO Hong-Qiang LUO Yu-Chen ZHANG Ya-Wen
ZHANG Guang-Jie Siriguleng*

*Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology for Animal Diseases, Ministry of Agriculture,
College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China*

Abstract: **[Objectives]** After long-term natural selection, the Bactrian Camel (*Camelus bactrianus*) has many special biological characteristics, such as strong thirst tolerance, hunger tolerance and the ability to adapt to bad weather. Nesfatin-1 is a peptide composed of 82 amino acids. It is derived from the protein hydrolysis of its precursor NUCB2 in prohormone convertases (PCS) at Lys 83 - Arg 84 site. It can regulate the efficiency of energy metabolism and inhibit appetite. To study the distribution and expression of NUCB2/Nesfatin-1 in Bactrian camels, in order to explore whether Bactrian camels have a unique way of energy metabolism and whether it is related to the absence of metabolic diseases. **[Methods]** The hapten polypeptide of specific epitope of Bactrian camel NUCB2/Nesfatin-1 protein was synthesized by chemical synthesis method. The hapten was coupled with keyhole limpet hemocyanin (KLH) by maleimide method, and polyclonal antibody against single antigenic epitope of NUCB2/Nesfatin-1 protein was prepared by immunizing animals, Western blot was used to detect the expression of NUCB2/Nesfatin-1 protein in the hypothalamus (arcuate nucleus, solitary tract nucleus, ventromedial nucleus), anterior peak fat, posterior peak fat, stomach (tissue around gastric fundus gland), duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, pancreas, liver and abdominal adipose tissue of Bactrian camel. The expression of NUCB2/Nesfatin-1 mRNA in the above tissues was also detected by fluorescence quantitative PCR. *T*-test analysis was used to analyze the results by using graphpad prism 5.0 software. **[Results]** The synthesized Bactrian Camel NUCB2/Nesfatin-1 protein had few polypeptide heteropeaks at specific epitopes, and its purity was calculated to be more than 95%. The mass charge ratio $[M + 4H]^{4+}$ and $[M + 3H]^{3+}$ of the polypeptide was in line with its expectation (Fig. 1, 2). The titer of the polyclonal antibody against NUCB2/Nesfatin-1 protein determined by indirect ELISA was 5.12×10^5 , and the polyclonal antibody was successfully prepared (Fig. 4). The prepared polyclonal antibody of NUCB2/Nesfatin-1 was used to detect the distribution of NUCB2/Nesfatin-1 protein various tissues and organs mentioned above. It was significantly expressed in adipose tissue and pancreas of Bactrian Camel (Fig. 7, 8). The distribution of NUCB2/Nesfatin-1 mRNA in Bactrian camel was detected by fluorescence quantitative PCR. It was found that the gene was expressed in the detected tissues, especially in abdominal fat and liver tissues (Fig. 9). **[Conclusion]** In this study, a specific antibody against Bactrian Camel NUCB2/Nesfatin-1 protein was successfully prepared by analyzing antigen epitopes and synthesizing peptides, and the antibody has high titer and strong specificity. The distribution of NUCB2/Nesfatin-1 in Bactrian Camels was detected at the protein level by the successfully prepared specific antibody, and then the distribution of NUCB2/Nesfatin-1 in Bactrian Camels was detected at mRNA level by fluorescence quantitative PCR. Through the analysis of the results, it is found that NUCB2/Nesfatin-1 is highly expressed in the peripheral

adipose tissue, and it may play a role in inhibiting appetite in the regulation of thirst and hunger tolerance mechanism of Bactrian camel, so that Bactrian Camel can endure long-term hunger. It is speculated that NUCB2/Nesfatin-1 protein may inhibit the differentiation of adipocytes, promote the hydrolysis of lipid droplets in adipocytes and provide energy for the body in Bactrian Camel. Its specific function in adipocytes needs our further study.

Key words: Nesfatin-1; Polyclonal antibodies; Bactrian camel; Tissue distribution

近年来由于人类社会生产力的逐步提高,人们的生活水平得到了大幅度提高,随之而来的,肥胖人群的数量也在大幅度的增加,然而过度的肥胖必然会导致机体出现各种代谢性疾病(Cao 2014),而且还影响形体的美感和日常活动。所以解决肥胖问题已经是现在的一个重大难题。Nesfatin-1 作为一种神经脂肪肽(Oh-I et al. 2006),其氨基酸序列在哺乳动物和非哺乳动物中高度保守(Morton et al. 2018),其可以调节机体的能量代谢效率,对食欲有抑制作用。在大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)的研究中发现,Nesfatin-1 是一种由 82 个氨基酸组成的肽,通过其前体物质 NUCB2 在 Lys 83 ~ Arg 84 位点通过前激素转化酶(prohormone convertases, PCs)蛋白质水解而来,所以 Nesfatin-1 片段为 1~82。NUCB2 可能被加工成的片段还包括 Nesfatin-2(残基 85~163)和 Nesfatin-3(残基 166~396),但只有 Nesfatin-1 或全长 NUCB2 具有诱导厌食的潜在作用。研究表明,NUCB2 抑制食欲的作用需要其水解为 Nesfatin-1(Oh-I et al. 2006)。目前有证据表明,NUCB2/Nesfatin-1 分布于一些外周代谢组织中,比如分布在胰腺(Stengel et al. 2013)、胃肠道(Stengel et al. 2009)以及脂肪组织(Ramanjaneya et al. 2010)等。而双峰驼(*Camelus bactrianus*)作为一种具有特殊能量代谢机制的物种,其体内的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白和基因的分布,对其是否存在重要的意义需要进行深入的研究。近些年来,有关于 Nesfatin-1 的研究大多数集中在人(Zhang et al. 2012)、啮齿类(Oh-I et al. 2006)、鱼(Zhang et al. 2018)等动物的消化系统上。双峰驼经过长

期的自然选择,具备了许多特殊的生物学特性,比如极强的耐渴、耐饥饿及适应恶劣气候等能力(杨永青等 2021),而且双峰驼的血糖水平比其他反刍动物高两倍多(Elmahdi et al. 1997, Kaske et al. 2001, Jirimutu et al. 2012),但是它们不会因此发生代谢性疾病(如糖尿病)或显示相关的病理学特征。研究双峰驼体内 NUCB2/Nesfatin-1 的分布与表达,可以探究双峰驼体内是否具有特有的能量代谢方式,与其不会发生代谢性疾病是否有一定的联系,比如骆驼在冬天驼峰中脂肪对抵御饥饿和寒冷是否起重要作用,成为本研究的方向。制备针对 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白单一抗原表位的多克隆抗体,用于检测双峰驼体内 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的分布。通过查找双峰驼的 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 特异性序列,设计并合成 NUCB2/Nesfatin-1 基因的引物,用于检测双峰驼体内各种组织中 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 的表达。通过分析双峰驼体内 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白和基因的分布与表达情况,不仅在一定程度上丰富 NUCB2/Nesfatin-1 调节哺乳动物摄食及消化的研究内容,还可以分析 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的作用与双峰驼耐渴、耐饥饿是否存在一定的关系,以及是否在双峰驼抵御寒冷的机制中起到一定的作用。为后续研究 NUCB2/Nesfatin-1 与脂肪细胞代谢的调节关系,做一些前期的铺垫研究,最终可以为肥胖以及一些代谢方面的疾病提供一个新的解决方法。

1 材料与方法

1.1 材料

免疫用纯种新西兰兔,雄性健康,4~5 月

龄, 体重 2.5 kg 左右, 购自北京市昌扬西山养殖场。实验所用 9 峰双峰驼的血清采集自卓资县十八台乡骆驼养殖场, 使用无菌采血管采集血液, 离心得到血清, 保存于 -80 °C 冰箱。实验所需组织样品, 采自内蒙古自治区四子王旗养殖的 3 峰健康的双峰驼, 屠宰后立即采集下丘脑(弓状核、孤束核和腹内侧核)、前峰脂肪、后峰脂肪、胃(胃底腺周围组织)、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、胰腺、肝以及腹部脂肪。预冷生理盐水漂洗后, 吸去多余水分, 迅速使用液氮冷冻, 之后转移至实验室 -80 °C 冰箱保存。Nesfatin-1 抗原表位多肽由北京华大蛋白质研发中心有限公司合成。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 扩增 *NUCB2* 的引物序为 NUCB2-pF: 5' TCG AGA GCC TGT TAA GAA TCA GC 3', NUCB2-pR: 5' AGT ATG GTC CTC CAC TTC ATC TTT 3'; 扩增 β -actin 的引物序为 β -actin-pF: 5' GGA CTT CGA GCA GGA GAT GG 3', β -actin-pR: 5' AGG AAG GAG GGC TGG AAG AG 3'。

实验于 2020 年 7 月至 2021 年 5 月在内蒙古自治区呼和浩特市内蒙古农业大学兽医学院动物生理研究室进行。

1.2 表位多肽的设计

在 NCBI 查找双峰驼的 *NUCB2* 蛋白序列, 选定蛋白序列 XP_010963104.1, 通过 DNASTAR 软件进行分析, 根据蛋白序列二级结构分析及亲疏水性和抗原性等, 选取抗原表位多肽片段。经过分析, 从 1~82 氨基酸选取特异性、抗原性及亲疏水性较优抗原序列。所选取的氨基酸序列为 Pep: C*ETDSHFREKLQKAD, 其中 C* (半胱氨酸) 人为添加(李文静等 2018), 以便于后期与血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH) 和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 进行偶联, 分别作为免疫原和包被原。

1.3 多肽的合成

通过化学合成的方法合成双峰驼 *NUCB2*/

Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽, 合成的双峰驼 *NUCB2*/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC) 纯化到 95% 的纯度。用质谱法证实双峰驼 *NUCB2*/Nesfatin-1 蛋白特定表位多肽的质量。

1.4 多肽与血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA) 进行偶联

通过马来酰亚胺法(廖黔宁等 1999) 使多肽与血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA) 进行偶联。使用 Ellman 试剂法(唐文力等 2021) 检测是否偶联。通过测定半胱氨酸(Cys) 含量确定多肽与牛血清白蛋白(BSA) 的偶联效率(吴萌等 2007)。实验进行前先利用半胱氨酸标准品绘制出半胱氨酸标准曲线, 然后将偶联前后样品测量值带入标准曲线中即可得到样品中半胱氨酸的浓度变化, 计算得到多肽与牛血清白蛋白(BSA) 的偶联率, 偶联率 = 100% (1 - 偶联后样品半胱氨酸浓度/偶联前样品半胱氨酸浓度)。

1.5 多克隆抗体的制备及效价测定

在免疫前对新西兰大白兔进行耳缘静脉采血, 收集血清作为阴性血清。将免疫原用灭菌生理盐水充分溶解, 首次免疫使用弗氏完全佐剂(Sigma 公司) 进行乳化, 在新西兰大白兔背部选取 4 个部位进行皮下注射, 每个点的注射剂量为 500 μ l。3 周、5 周和 7 周分别进行第 1 次、第 2 次和第 3 次加强免疫, 与首次免疫相同的方式进行皮下注射。在第 3 次加强免疫 10 d 后, 耳缘静脉采血, 使用间接 ELISA 法测定抗体效价(奥斯伯等 2005, Delahaut 2017)。在本实验中, 采用双峰驼 *NUCB2*/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽与牛血清白蛋白(BSA) 偶联作为包被原, 包被原的浓度为 1 g/L。在进行间接 ELISA 实验中, 阳性结果的判断标准为以阴性孔的 A_{450} 值为标准, 检测样本孔的 A_{450} 值/阴性孔的 A_{450} 值大于 2.0, 确定为阳性反应。

1.6 多克隆抗体的亲和纯化

将 2 ml SulfoLink Coupling 树脂加入到亲和柱中, 在其中加入 5 mg 多肽, 使其偶联到亲和性树脂柱上。使用 4 °C 离心机将抗血清进行离心, 以除去其中颗粒或红细胞, 使用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 将抗血清进行 1:1 稀释。使用亲和柱对抗血清进行纯化, 洗脱液即为多克隆抗体。使用超滤管 (截留分子量为 10 ku) 对洗脱液进行浓缩, 将其浓缩至 1~2 g/L, 在其中混合 30%~50% 的甘油于 -20 °C 保存。

1.7 多克隆抗体的电泳鉴定

使用聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 制备试剂盒配制胶体, 根据目的蛋白的分子量大小选择制备 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。将纯化好的多克隆抗体调整至合适浓度, 在其中加入四分之一体积的蛋白上样缓冲液, 使用金属浴进行蛋白质变性, 条件为 100 °C, 5 min, 冰浴迅速冷却, 1 000 r/min 离心 2 min。电泳结束后, 将凝胶取下置于成像设备中进行显影成像。

1.8 双峰驼组织 Western Blot 实验

取出冻存于 -80 °C 冰箱中的双峰驼组织, 分别放入 1.5 ml 的离心管中, 在每个离心管中加入 8 颗磁珠, 然后在其中加入已经配制好的动物组织裂解液, 使用组织匀浆器进行研磨。破碎后, 混匀震荡, 然后离心取上清。所有过程在冰上进行操作。使用 BCA 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 测定提取的蛋白浓度, 使用 10% 的 SDS-PAGE 分离胶、5% 的浓缩胶分离蛋白, 然后通过半干转的方式, 转移到 PVDF 膜上, 使用 5% 的脱脂奶粉封闭 3 h, TBST 清洗, 4 °C 孵育一抗 (上述步骤 1.6 中亲和纯化的抗体) 过夜, TBST 清洗 5 次, 每次 10 min。二抗 [辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 常温孵育 1 h, TBST 清洗 5 次, 每次 10 min。使用 ECL 发光显色试剂盒 (Thermo-fisher) 对条带进行显影成像, 最后的图像通过分析软件

ImageJ 进行光密度分析比较。

1.9 实时荧光定量 PCR 实验

取出保存在 -80 °C 冰箱中的双峰驼组织, 按照 Axygen Scientific 的总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA, RNA 反转录为 cDNA 按照 Takara 的反转录试剂盒说明书进行操作。反转录的 cDNA 保存在 -80 °C 冰箱。使用 NUCB2/Nesfatin-1、 β -actin 基因引物, 进行荧光定量 PCR 检测, β -actin 作为内参基因。通过使用荧光定量 PCR 仪检测完成的结果进行数据统计与分析。

1.10 统计与分析

采用 GraphPad Prism5.0 软件统计分析。实验数据以平均值 \pm 标准差表示, 使用 t 检验分析。 $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P \geq 0.05$ 表示差异不显著。荧光定量 PCR 结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行处理。

2 结果

2.1 表位多肽合成的准确度及纯度分析

设计好的双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽经过化学合成, 通过高效液相色谱法 (HPLC) 检测多肽纯度 (图 1), 通过质谱检测其准确性 (图 2)。从图 1 中可以看出, 合成的双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位多肽纯度很高, 杂峰很少, 经过机器自动计算其纯度大于 95%。从图 2 中可以看出, 双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽的质荷比 (m/z) $[M + 4H]^{4+}$ 、 $[M + 3H]^{3+}$ 离子峰所得到的分子量与预期的双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽质量 1 806.98 吻合, 从而证明合成双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位的多肽的序列的准确性。

2.2 多肽偶联效果的测定

使用半胱氨酸标准品获得半胱氨酸吸光度值的标准曲线 (图 3)。通过测定双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位多肽偶联前后的半胱氨酸含量, 确定双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位多肽与血蓝蛋白 (KLH) 和牛血清白

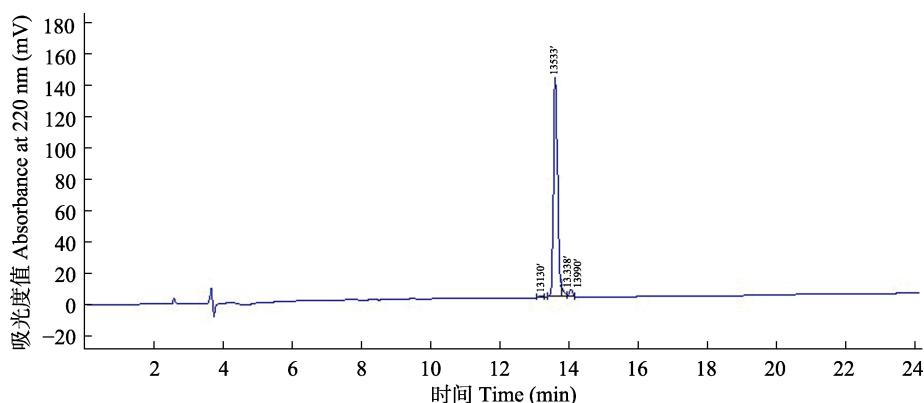


图 1 多肽合成纯度的高效液相色谱检测结果

Fig. 1 The high performance liquid chromatography (HPLC) result of the peptide

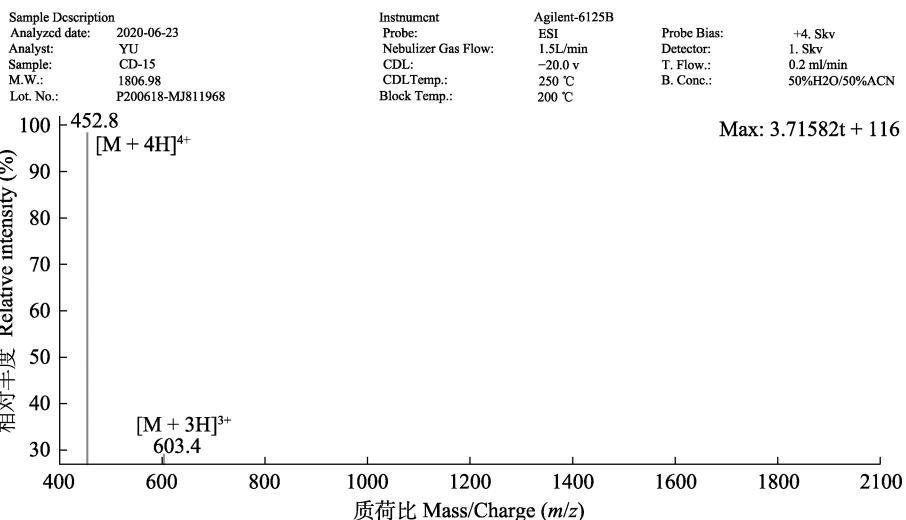


图 2 合成多肽的质谱检测结果

Fig. 2 The msaa spectrometry (MS) result of the peptide

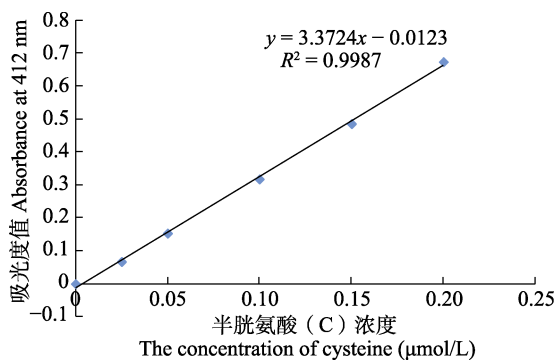


图 3 半胱氨酸标准曲线

Fig. 3 The standard curve of cysteine

蛋白 (BSA) 的偶联率分别为 84.1%和 77.9%。结果表明, 双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白特定表位多肽与载体蛋白血蓝蛋白和牛血清白蛋白连接效果理想, 可以作为免疫原和包被原使用。

2.3 兔多克隆抗体效价的测定

使用间接 ELISA 法测定抗体效价, 是多克隆抗体效价测定的常用方法。经过计算多克隆抗体的效价在 5.12×10^5 以上 (图 4)。

2.4 兔多克隆抗体的亲和纯化

经过抗体亲和纯化后的多克隆抗体, 金属浴变性后, 通过 SDS-PAGE 电泳, 分别在 55 ku

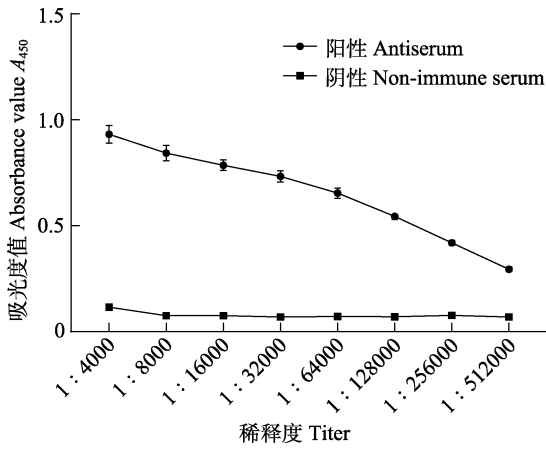


图 4 多克隆抗体的效价测定

Fig. 4 Analysis of antiserum titer by ELISA

和 25 ku 出现两条带 (图 5), 分别为重链和轻链, 显示抗体为 IgG。

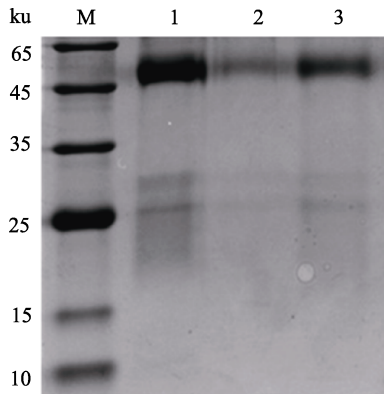


图 5 多克隆抗体 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis of polyclonal antibody

M. 蛋白分子量标准; 1、2、3 分别为纯化后的多克隆抗体。
M. Marker; 1, 2 and 3 showed the purified polyclonal antibody.

2.5 多克隆抗体检测双峰驼血清中 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白

9 峰骆驼血清的免疫印迹结果 (图 6) 中可以看出, 在 55 ku 处 9 峰骆驼均出现阳性条带, 与预期中 NUCB2/Nesfatin-1 的目的蛋白大小为 47.5 ~ 55 ku 一致, 说明制备的多克隆抗体可

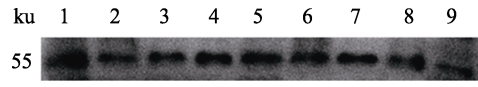


图 6 9 峰骆驼 Western blot 印迹分析
Fig. 6 Western blot analysis of serum in 9-peak Camel

1 ~ 9 为双峰驼血清的免疫印迹图。
1 ~ 9 were the Western blotting maps of Bactrian Camel serum.

以特异性识别双峰驼体内的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白。

2.6 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在双峰驼 15 种组织中的表达

对 3 峰双峰驼组织中的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白表达量进行分析, 双峰驼 a 的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在后峰脂肪中表达量较高, 而在前峰脂肪、腹部脂肪、胰腺、肝、弓状核、孤束核和腹内侧核中表达量较低 (图 7a, 图 8);

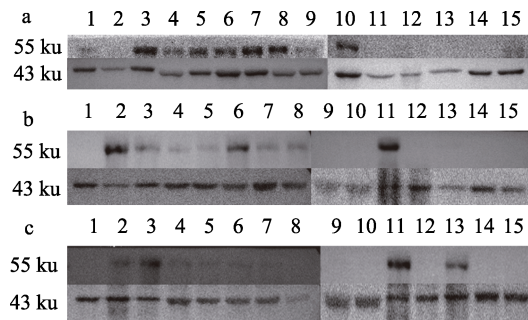


图 7 双峰驼 15 种组织 Western blot 印迹分析

Fig. 7 Western blot analysis of NUCB2/Nesfatin-1 expression 15 tissues of Bactrian Camel

a、b、c 分别为 3 峰双峰驼个体。Western Blot 图 a、b 和 c 中泳道依次为, 1. 弓状核; 2. 前峰脂肪; 3. 后峰脂肪; 4. 胃; 5. 十二指肠肠; 6. 空肠; 7. 回肠; 8. 盲肠; 9. 结肠; 10. 直肠; 11. 胰腺; 12. 肝; 13. 腹部脂肪; 14. 孤束核; 15. 腹内侧核。NUCB2/Nesfatin-1 蛋白为 55 ku, β-actin 内参蛋白为 43 ku。

a, b and c showed three Bactrian Camel individuals respectively. Lines in a, b and c of Western blot are 1. Arcuate nucleus; 2. Anterior peak fat; 3. Posterior peak fat; 4. Stomach; 5. Duodenum; 6. Jejunum; 7. Ileum; 8. Cecum; 9. Colon; 10. Rectum; 11. Pancreas; 12. Liver; 13. Abdominal fat; 14. Nucleus tractus solitarius; 15. Ventromedial nucleus. NUCB2/Nesfatin-1 protein is 55 ku, the β-actin internal reference protein was 43 ku.

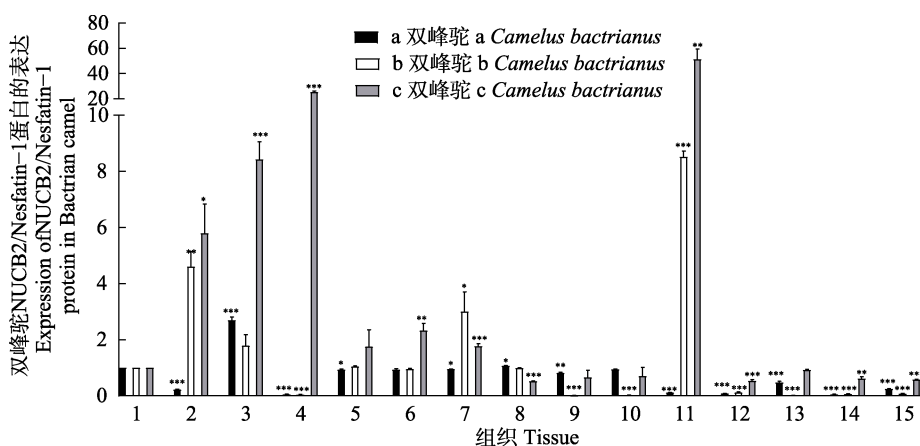


图 8 双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白分布

Fig. 8 Distribution of NUCB2/Nesfatin-1 protein in various tissues and organs of Bactrian Camel

柱状图为 a、b 和 c 双峰驼 15 种组织中 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的相对含量，将回肠的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白含量定为 1，每峰骆驼 15 种组织进行组内对比，*** 差异极显著 ($P < 0.001$)，** 差异非常显著 ($P < 0.01$)，* 差异显著 ($P < 0.05$)。

The histogram shows the relative content of NUCB2/Nesfatin-1 protein in 15 tissues of a, b and c Bactrian Camels. The content of NUCB2/Nesfatin-1 protein in 1. ileum is set as 1. 15 tissues of each camel are compared within the group. ***. extremely significant difference between the treatments ($P < 0.001$), ** the representative difference was very significant ($P < 0.01$), * significant difference between treatments ($P < 0.05$).

1. 回肠; 2. 前峰脂肪; 3. 后峰脂肪; 4. 腹部脂肪; 5. 胃; 6. 十二指肠; 7. 空肠; 8. 盲肠; 9. 结肠; 10. 直肠; 11. 胰腺; 12. 肝; 13. 弓状核; 14. 孤束核; 15. 腹内侧核
 1. Ileum; 2. Anterior peak fat; 3. Posterior peak fat; 4. Abdominal fat; 5. Stomach; 6. Duodenum; 7. Jejunum; 8. Cecum; 9. Colon; 10. Rectum; 11. Pancreas; 12. Liver; 13. Arcuate nucleus; 14. Nucleus tractus solitarius; 15. Ventromedial nucleus

双峰驼 b 的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在前峰脂肪、空肠和胰腺中表达量较高，而在腹部脂肪、结肠、直肠、肝、弓状核、孤束核和腹内侧核表达量较低 (图 7b, 图 8); 双峰驼 c 的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在前峰脂肪、后峰脂肪、腹部脂肪、十二指肠、空肠和胰腺中表达量较高，而在盲肠、肝、孤束核和腹内侧核中表达量较低 (图 7c, 图 8)。综合上述结果，双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在脂肪中表达量较高，而在肝、孤束核和腹内侧核中表达量较低。

2.7 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 在双峰驼 15 种组织中的表达

对 3 峰双峰驼组织中 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 的表达量进行分析 (图 9)，双峰驼 a 在腹部脂肪、肝和腹内侧核中相对表达量高，双峰驼 b 在前峰脂肪、腹部脂肪、胃和肝中相对表达量高，双峰驼 c 在腹部脂肪和肝中相对表

达量高。综合上述结果，双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 在腹部脂肪和肝中表达量很高。

3 讨论

Nesfatin-1 作为一种神经肽，在中枢和周围的组织中均有广泛的分布和表达，其可以参与不同病理生理状态的调节。近年来越来越多的研究报道，其对机体的能量代谢具有一定的调节作用。其与肥胖 (Yang et al. 2017)、糖尿病 (Zhang et al. 2012) 和心血管 (Ramesh et al. 2017) 疾病等具有一定的相关性已经成为学术界的共识。

3.1 NUCB2/Nesfatin-1 多克隆抗体的制备

通过抗原设计进行多肽合成的方法，本研究成功制备针对双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白单一抗原表位的多克隆抗体，该抗体既能特

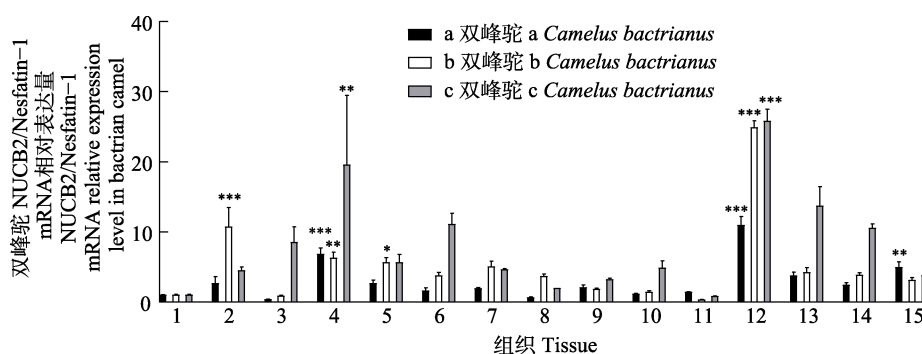


图9 双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 表达量

Fig.9 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA expression in different tissues and organs of Bactrian Camel

图为 a、b 和 c 双峰驼 15 种组织中 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 的相对含量, 将回肠的 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 含量定为 1, 每峰骆驼 15 种组织进行组内对比, *** 差异极显著 ($P < 0.001$), ** 差异非常显著 ($P < 0.01$), * 差异显著 ($P < 0.05$)。

The figure shows the relative content of NUCB2/Nesfatin-1 mRNA in 15 tissues of a, b and c Bactrian camels. The content of NUCB2/Nesfatin-1 mRNA in 1. ileum is set as 1. 15 tissues of each camel are compared within the group. *** extremely significant difference between the treatments ($P < 0.001$), ** the representative difference was very significant ($P < 0.01$), * significant difference between treatments ($P < 0.05$).

1. 回肠; 2. 前峰脂肪; 3. 后峰脂肪; 4. 腹部脂肪; 5. 胃; 6. 十二指肠; 7. 空肠; 8. 盲肠; 9. 结肠; 10. 直肠; 11. 胰腺; 12. 肝; 13. 弓状核; 14. 孤束核; 15. 腹内侧核

1. Ileum; 2. Anterior peak fat; 3. Posterior peak fat; 4. Abdominal fat; 5. Stomach; 6. Duodenum; 7. Jejunum; 8. Cecum; 9. Colon; 10. Rectum; 11. Pancreas; 12. Liver; 13. Arcuate nucleus; 14. Nucleus tractus solitarius; 15. Ventromedial nucleus

异性检测 Nesfatin-1 蛋白, 也能检测其前体蛋白 NUCB2 蛋白。由于设计的多肽质量较小, 只能作为半抗原使用, 需要与载体蛋白 (Wang et al. 2007) 进行连接来增强其免疫原性, 确保可以激发机体产生高浓度的抗体。在实验过程中, 通过使用血蓝蛋白 (KLH) 作为载体蛋白与多肽连接制备成免疫原, 使用牛血清白蛋白 (BSA) 与多肽连接制备成包被原, 这使得实验可以排除载体蛋白的干扰, 可以使抗体的灵敏度以及效价都得到有效的保证。

3.2 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 和蛋白在双峰驼组织中分布的差异

本研究中, 双峰驼的胰腺中 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的相对表达量较高。有研究表明, NUCB2/Nesfatin-1 是一种促胰岛素多肽, 使用 NUCB2/Nesfatin-1 短时间刺激在葡萄糖刺激下的原代胰岛细胞和 min6 胰岛细胞系, 都可以增强胰岛细胞和 min6 胰岛细胞在葡萄糖刺激下的胰岛素分泌 (glucose-stimulated

insulin secretion, GSIS) 功能 (Gonzalez et al. 2011)。在其他研究中发现, 在大鼠或小鼠的胰岛分布有 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白, 并在胰岛中进行分泌 (Foo et al. 2010)。结合本研究结果推测, NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在胰腺中有可能参与双峰驼的血糖调节, 帮助双峰驼稳定体内的血糖平衡。本研究发现, 在双峰驼的前峰脂肪、后峰脂肪和腹部脂肪中, NUCB2/Nesfatin-1 蛋白的表达量都相对较高。这是由于采样季节在冬季, 双峰驼普遍依靠驼峰和全身的脂肪提供营养。在 Ramanjaneya 等 (2010) 的发现中提到, Nesfatin-1 蛋白被证实人类和啮齿动物的脂肪中表达, 这与对双峰驼的研究结果相符。Tagaya 等 (2012) 研究, 发现了 NUCB2/Nesfatin-1 的一种新的生理功能, 其可以抑制脂肪细胞的分化。这与双峰驼可以适应恶劣的环境有一定关联, 在营养充足的情况下双峰驼在驼峰和腹部储存脂肪, 在条件恶劣的环境中可以依靠驼峰和腹部储存的脂肪为自身提供能量。本研究

对双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 进行荧光定量 PCR 分析发现,其在肝组织和腹部脂肪中的相对表达量较高,但在胰腺中的相对表达量并不高,这与 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在双峰驼体内的分布情况并不对应。Nakata 等 (2011) 研究发现,NUCB2/Nesfatin-1 通过促进 L 型 Ca^{2+} 通道的 Ca^{2+} 内流而增强葡萄糖诱导的胰岛素分泌,而不依赖于小鼠胰岛 β 细胞中的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)。Riva 等 (2011) 发现,NUCB2/Nesfatin-1 是一种新的胰高血糖素刺激肽,其可以强烈刺激离体小鼠胰岛分泌胰高血糖素,并没有发现 NUCB2/Nesfatin-1 影响离体小鼠胰岛或 INS-1 (832/13) 细胞分泌胰岛素,但是 NUCB2/Nesfatin-1 在小鼠的体内实验中刺激了小鼠的胰岛素分泌。胰岛素和胰高血糖素存在拮抗作用,而 NUCB2/Nesfatin-1 通过促进葡萄糖诱导的胰岛素分泌,还可以强烈刺激离体胰岛分泌胰高血糖素,在双峰驼体内的高血糖环境下,高表达的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白促进胰岛素分泌,反过来胰高血糖素就会减少,而 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 的相对表达量就会变低。通过上述两篇文章的不同结果也就解释了 NUCB2/Nesfatin-1 在双峰驼体内的蛋白表达量较高。同样本研究结果,NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 在肝中的相对表达量高,但是蛋白的表达量就很低,原因可能是双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 没有转录翻译成蛋白并行使其功能,因为肝对维持机体糖稳态具有重要作用,主要用于储存肝糖原。本研究发现在双峰驼的弓状核、孤束核和腹内侧核等组织中并没有明显的 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白表达,但是双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 mRNA 在这些组织中均有分布,推测可能在这些组织中双峰驼 NUCB2/Nesfatin-1 基因的表达量很低,这与 Nesfatin-1 作为一种分布在中枢和外周组织中的神经脂肪肽相一致 (Oh-I et al. 2006),在中枢神经中只需要在低表达量的状态下就能行使其功能,刺激下游的外周组织进一步作用。

综上所述 NUCB2/Nesfatin-1 可能在双峰驼的耐渴、耐饥饿的机制调节中起到了抑制食欲的作用,使得双峰驼可以忍受长时间的饥饿,在双峰驼的外周脂肪组织中高表达,推测 NUCB2/Nesfatin-1 蛋白在双峰驼体内可能通过抑制脂肪细胞的分化,促进脂肪细胞中脂滴的水解为机体提供能量,其具体在脂肪细胞中的功能有待进一步研究。

参 考 文 献

- Cao H. 2014. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of Endocrinology*, 220(2): T47-T59.
- Delahaut P. 2017. Immunisation - Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. *Methods*, 116: 4-11.
- Elmahdi B, Sallmann H P, Fuhrmann H, et al. 1997. Comparative aspects of glucose tolerance in camels, sheep, and ponies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(1): 147-151.
- Foo K S, Brauner H, Ostenson C G, et al. 2010. Nucleobindin-2/n esfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *Journal of Endocrinology*, 204(3): 255-263.
- Gonzalez R, Reingold B K, Gao X D, et al. 2011. Nesfatin-1 Exerts a Direct, Glucose-Dependent Insulinotropic Action on Mouse Islet Beta and MIN6 Cells. *Journal of Endocrinology*, 208(3): R9-R16.
- Jirimutu, Wang Z, Ding G H, et al. 2012. Genome sequences of wild and domestic bactrian camels. *Nature Communications*, 3: 1202.
- Kaske M, Elmahdi B, Engelhardt W V, et al. 2001. Insulin responsiveness of sheep, ponies, miniature pigs and camels: results of hyperinsulinemic clamps using porcine insulin. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 171(7): 549-556.
- Morton K A, Hargreaves L, Mortazavi S, et al. 2018. Tissue-specific expression and circulating concentrations of nesfatin-1 in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 65: 56-66.
- Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, et al. 2011. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca^{2+} influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocrine Journal*, 58(4): 305-313.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. 2006. Identification of nesfatin-1

- as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112): 709–712.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown J E, et al. 2010. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*, 151(7): 3169–3180.
- Ramesh N, Gawli K, Pasupuleti V K, et al. 2017. Metabolic and cardiovascular actions of Nesfatin-1: Implications in health and disease. *Current Pharmaceutical Design*, 23(10): 1453–1464.
- Riva M, Nitert M D, Voss U, et al. 2011. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell and Tissue Research*, 346(3): 393–405.
- Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, et al. 2013. Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(6): 909–918.
- Stengel A, Goebel M, Wang L X, et al. 2009. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor 2 receptor. *Endocrinology*, 150(11): 4911–4919.
- Tagaya Y, Osaki A, Miura A, et al. 2012. Secreted Nucleobindin-2 inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Protein and Peptide Letters*, 19(9): 997–1004.
- Wang S T, Gui W J, Guo Y R, et al. 2007. Preparation of a multi-hapten antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 587(2): 287–292.
- Yang G T, Zhao H Y, Kong Y, et al. 2017. Study of the effects of nesfatin-1 on gastric function in obese rats. *World Journal of Gastroenterology*, 23(16): 2940–2947.
- Zhang X, Wang S Y, Chen H, et al. 2018. The inhibitory effect of NUCB2/nesfatin-1 on appetite regulation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). *Hormones and Behavior*, 103: 111–120.
- Zhang Z, Li L, Yang M, et al. 2012. Increased plasma levels of Nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 120(2): 91–95.
- 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 2005. 精编分子生物学实验指南. 4 版. 北京: 科学出版社, 476–708.
- 廖黔宁, 罗静初, 周培爱, 等. 1999. 眠纹捕鸟蛛毒素-I(HW TX-1) 28 肽类似物的化学合成与活性鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 15(5): 756–761.
- 李文静, 李利君, 吴瑜, 等. 2018. 蛋白质化学修饰的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 40(10): 1781–1786.
- 唐文力, 李宜航. 2021. Ellman 试剂显色法测定药物中乙酰半胱氨酸含量研究. *广州化工*, 49(8): 115–117.
- 吴萌, 闰静辉, 张小兵, 等. 2007. 肝细胞癌标志物 GPC3 表位肽抗体制备及其特性测定. *中华微生物学和免疫学杂志*, 27(7): 669–674.
- 杨永青, 王文曦, 李国银, 等. 2021. 阿拉善双峰驼及驼乳、驼肉研究概述. *畜牧与饲料科学*, 42(2): 109–113, 120.