

陈希文, 徐佳靖, 马畅, 等. 中国麻鸭血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 76-82.

CHEN X W, XU J J, MA C, et al. Prokaryotic expression of Chinese duck angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and preparation of polyclonal antibody [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 76-82.

## 中国麻鸭血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定

陈希文, 徐佳靖, 马畅, 王公民, 张源淑\*

(南京农业大学农业农村部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 旨在阐明鸭血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 的组织分布特征, 并建立相应的蛋白与抗体研究工具。以中国麻鸭为研究对象, 利用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法扩增鸭 ACE2 基因, 克隆至 pET32a 载体, 并转化入大肠杆菌中诱导表达, 筛选异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 ACE2 重组蛋白表达及纯化的最适条件, 以纯化的鸭 ACE2 重组蛋白为抗原免疫小鼠, 制备鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体。间接酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定抗体效价, 并验证其特异性等; 免疫荧光和蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 明确 ACE2 在鸭体内的分布和细胞学定位。结果: 成功构建了 pET32a-ACE2 原核表达载体, 获得鸭 ACE2 重组蛋白, 优化 IPTG 诱导表达的最适条件为: 2 mmol/L, 诱导 12 h; KCl 染色切胶法纯化。进一步证实该鸭 ACE2 重组蛋白为单链蛋白, 分子量约为 110 kDa, 等电点 (pI) 值为 5.61, 主要以包涵体形式存在。同时, 制备了鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体, 抗体效价为 1:12 800, 证实 ACE2 在鸭多组织内广泛存在, 主要于细胞膜上表达。综上, 该研究为进一步探索鸭 ACE2 的功能提供了试验依据和检测工具。

**关键词:** 中国麻鸭; 血管紧张素转化酶 2; 原核表达; 重组蛋白; 多克隆抗体

**中图分类号:** S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)12-0076-07

## Prokaryotic expression of Chinese duck angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and preparation of polyclonal antibody

CHEN Xiwen, XU Jiajing, MA Chang, WANG Gongmin, ZHANG Yuanshu\*

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** This study was conducted with the objective of clarifying the tissue distribution profile of duck angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and developing necessary protein and antibody research tools. In this experiment, by using Chinese spot-billed ducks as the model, the duck ACE2 gene was amplified by RT-PCR, cloned into the pET32a vector, and transformed into *E. coli* for induced expression. The optimal conditions for IPTG-induced expression and purification of the ACE2 recombinant protein were screened. Under the optimized conditions, subcutaneous multi-point immunization of BALB/c mice with the obtained duck ACE2 recombinant protein was performed to obtain mouse anti-duck ACE2 polyclonal antibodies. Then, the indirect ELISA method was used to determine the antibody titer and verify its specificity. Finally, the distribution and cytological localization of ACE2 were analyzed using Western blot and immunofluorescence. The results exhibited successful construction of the pET32a-ACE2 prokaryotic expression vector and the recombinant expression of the duck ACE2 protein. The optimal conditions for induction were determined as 2 mmol/L IPTG for 12 h, followed by protein purification using the KCl-stained gel excision method. Further analysis confirmed that the recombinant duck ACE2 protein existed as a single-chain protein with a molecular weight of approximately 110 kDa and an isoelectric point (pI) of 5.61, predominantly localized in the inclusion body fractions. Additionally, the immunization produced high-titer polyclonal antibodies (1:12 800). The immunoblot analysis confirmed the antibody's potent immunogenicity and exceptional species specificity. These results confirmed that ACE2 was widely expressed across multiple tissues in ducks, primarily localized on the cell membrane. In summary, this study provided experimental evidence and data for investigating the functional

收稿日期: 2025-02-18; 修回日期: 2025-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972640)

第一作者: 陈希文, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 张源淑, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物生物化学与分子生物学, E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn.

mechanisms of duck ACE2.

**Keywords:** Chinese duck; ACE2; prokaryotic expression; recombinant protein; polyclonal antibody

血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2), 作为肾素血管紧张素系统 (RAS) 中的核心活性成分, 通过水解血管紧张素 II (Ang II) 转化为血管紧张素 1-7 (Ang1-7) [1-2]。Ang1-7 通过 Mas 原癌基因编码的 G 蛋白偶联受体 (Mas 受体) 发挥诱导血管舒张和血管保护, 以及抗纤维化、抗增殖和抗炎等作用 [3-4]。目前, 关于 ACE2 的研究主要集中在人和鼠上, 鸭等水禽方面的研究尚缺乏资料。本研究以中国麻鸭为研究对象, 运用分子克隆技术建立并优化鸭 ACE2 的原核表达体系, 制备 ACE2 重组蛋白并免疫小鼠, 获得具有良好免疫原性和种属特异性鸭源 ACE2 多克隆抗体。利用所得多克隆抗体, 明确 ACE2 在鸭组织中的分布和细胞学定位, 填补鸭 ACE2 方面的基本信息资料, 为 ACE2 在鸭中的深入探索奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和细胞

2 只市售中国麻鸭, 体重 (2.14±0.20) kg。颈部放血处死后, 迅速采集心脏、肝脏、肺脏、肾脏、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、直肠组织, 保存在液氮中, 后转移至-80℃保存。4 只 SPF 级雌性 7 周龄 BALB/c 小鼠, 体重 (21.0±1.0) g, 购自杭州医学院, 动物许可证: SCXK (浙) 2019-0002。试验鼠饲养于南京农业大学逸夫楼实验动物中心屏障环境动物房, 使用许可证: SYXK (苏) 2017-0007。鸡胚成纤维细胞 (DF-1) 由南京农业大学动物生物化学实验室液氮罐保存。

### 1.2 主要试剂

pET32a 质粒、RNA 反转录试剂购自 TaKaRa 公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、DH5α 感受态细胞、BL21 感受态细胞购自南京寿德公司; 抗体类包括羊抗兔 ACE2 单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、FITC 标记羊抗鼠 IgG 均购自 ABclonal 公司; 质粒提取试剂盒购自康为世纪生物公司; Trans Start Fast Pfu DNA Polymerase 购自 TRANS 公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的鸭 ACE2 基因序列 (MK836421), 设计特异性引物, F: 5'-CGAAAGCTTATGTTGGCTCACGTCTTGCTTCTCT-3'; R: 5'-TGGGATCCCTAAAATGATGTTTGTGTCGTCAGATAGTTA-3', 送至南京擎科生物科技有限公司合成, 下划线处

分别为 BamH I、Hind III 酶切位点。

### 1.4 原核表达重组质粒的构建与鉴定

取约 100 mg 上述采集的鸭心脏、肝脏等组织, TRIzol 法提取总 RNA, 测定 RNA 的浓度和纯度后, 二步法反转录。以 cDNA 为模板, 扩增鸭 ACE2 基因。扩增条件: 95℃ 5 min; 95℃ 20 s, 59℃ 20 s, 72℃ 75 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。PCR 结束后取扩增产物, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定。聚合酶链式反应 (PCR) 产物经琼脂糖电泳后, 于紫外线下快速切下目的条带 (鸭 ACE2 基因), 用干净滤纸吸去电泳液并称量重量。参考 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收纯化目的基因。取目的基因和 pET32a 载体进行 BamH I、Hind III 双酶切。酶切产物按照目的基因与 pET32a 载体摩尔比 3:1 于 16℃ 连接 12 h。

参考 DH5α 感受态细胞说明书, 将连接产物转入 DH5α 感受态细胞。转化后细胞涂布于含氨苄的 LB 固体培养基 (LB Agar), 37℃ 培养 12 h。挑取白色单菌落并用无酶水稀释, 取 2 μL 菌液进行 PCR, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定正确的菌液进行扩大培养, 提取质粒进行单、双酶切验证。验证正确后送至南京擎科生物公司测序。

### 1.5 鸭 ACE2 重组蛋白的诱导表达及鉴定

参考 BL21 感受态细胞说明书, 将构建成功的鸭 pET32a-ACE2 质粒转入 BL21 感受态细胞中。转化后细胞涂布于含氨苄的 LB 固体培养基, 37℃ 培养 12 h。挑取单菌落于 37℃, 180 r/min 摇床培养 6 h 后, 每隔 1 h 测定菌液 OD<sub>600 nm</sub> 值, 直至菌液 OD<sub>600 nm</sub> 值为 0.6~0.8。进行 IPTG 诱导表达: 对 IPTG 诱导时间 (0、2、4、6、8、10、12、14、16 h) 和诱导浓度 (终浓度为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 mmol/L 的 IPTG) 进行筛选。按照优化的 IPTG 诱导条件诱导表达后, 离心弃上清液, 溶解沉淀后超声破碎细胞。再次离心收集破碎液上清液和沉淀。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对 ACE2 重组蛋白的表达形式进行鉴定。

### 1.6 鸭 ACE2 重组蛋白的纯化及鉴定

通过筛选与对比, 选用 KCl 染色切胶法, 进行鸭 ACE2 重组蛋白纯化。将获得的包涵体溶液进行 SDS-PAGE。电泳结束后, 用 0.25 mol/L 的 KCl 溶液染色 10 min, 切下被染成银白色的目的条带并碾碎, PBS 溶解, 离心取上清液, 上清液即为所制 ACE2 重组蛋白。通过 SDS-PAGE 和蛋白质免疫印迹法 (Western blot, WB) 验证其纯度。

SDS-PAGE 结束后, 凝胶分为 2 份: 一份用于考马斯亮蓝染色, 一份进行 WB 试验, 湿转法, 100 V 转印 90 min 至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。脱脂奶粉封闭, 1:1 000 倍稀释的羊抗兔 ACE2 单克隆抗体孵育。1:5 000 稀释的羊抗兔二抗 (HRP 标记) 孵育, 加曝光液, 于全自动化学发光图像分析系统中显色, 并拍照观察。

### 1.7 鸭 ACE2 重组蛋白性质鉴定

#### 1.7.1 鸭 ACE2 重组蛋白肽链组成及分子量的测定

通过未变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和变性 SDS-PAGE 这 2 种方法确定该 ACE2 重组蛋白的肽链组成。4% 浓缩胶, 工作电压 100 V, 10% 分离胶工作电压 150 V。电泳结束后, 考马斯亮蓝染色, 30 min 后脱色液脱色至胶面背景透明无色。观察电泳条带是否存在亚基, 确定该鸭 ACE2 重组蛋白的肽链组成。然后通过 SDS-PAGE 半对数坐标法测定该鸭 ACE2 重组蛋白分子量<sup>[5]</sup>。

具体步骤: 凝胶经考马斯亮蓝染色、脱色后, 测量每条标准蛋白电泳条带以及溴酚蓝前沿与分离胶前沿之间的距离, 即迁移距离。按照上述公式, 根据所测迁移距离求得各条带的迁移率 ( $R_f$ )。分别以标准蛋白相对  $R_f$  和分子量对数为横、纵坐标, 绘制出标准曲线。用同样的方法测得鸭 ACE2 重组蛋白的  $R_f$  值, 由此, 可从曲线或得出的参数方程中计算出鸭 ACE2 重组蛋白的分子量。

计算公式:  $\lg(MW) = a - bX$ ,

式中,  $X$  为迁移率  $R_f$ 。

$R_f$  = 样品迁移距离 / 指示剂迁移距离。

#### 1.7.2 鸭 ACE2 重组蛋白等电点 (pI) 值的测定

参考纪晓霞<sup>[6]</sup>方法: 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (IEF-PAGE) 测定鸭 ACE2 重组蛋白 pI 值。两性电解质 pH 值范围为 4~10, 凝胶浓度 10%。稳压电泳, 起始电流 2 mA/管。电泳结束后准确测量各胶条的长度。从阳极端每隔 0.5 cm 切下胶段, 分别放至小烧杯中抽提。结束后测定 pH 值, 以对应的 pH 值和凝胶长度为横、纵坐标, 绘制出 pH 值曲线。通过所得曲线求出鸭 ACE2 重组蛋白等电点。

### 1.8 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体的制备及鉴定

#### 1.8.1 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体的制备

适应饲养 7 d 后, 将 4 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为对照组和试验组。小鼠称重后进行眼眶采血。用纯化的鸭 ACE2 重组蛋白皮下多点免疫小鼠。将 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ACE2 重组蛋白与弗氏完全佐剂 (FCA) 1:1 混合后, 超声制备成油包水乳液。试验组每只小鼠 1 mL 乳化蛋白, 对照组为每只 1 mL 生理盐水, 于背部皮下多点免疫。每间隔 2 周免疫 1 次, 除首免外,

后 4 次免疫使用弗氏不完全佐剂 (FICA)。经 5 次免疫后, 使用毛细管采取每只小鼠眼眶血液, 获取小鼠血清,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存待用。

#### 1.8.2 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体效价测定

使用间接酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 法, 用抗原包被液将鸭 ACE2 重组蛋白稀释为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ , 于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  包被 12 h。洗涤后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  以 2 倍梯度稀释 (1:50~1:819 200) 血清,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h。洗涤后加入 1:5 000 稀释的羊抗鼠二抗 (HRP 标记)。弃二抗, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺显色液 (TMB) 显色液作用 15 min, 加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。测定每孔  $OD_{450\text{ nm}}$  值, 并计算阳性血清 OD 值 (P) 和阴性血清 OD 值 (N) 之比。

#### 1.9 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体的鉴定

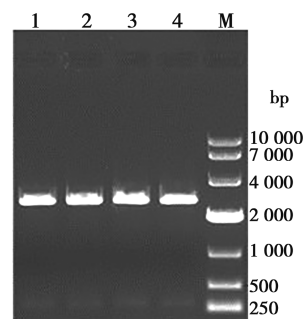
WB 法检测 ACE2 在鸭心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺、十二指肠、空肠、直肠等各个组织的表达, 其中一抗使用 1:1 600 倍稀释的上一步制备的鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体, 二抗使用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000 稀释), 其余步骤同 1.6。提取鸭、白羽肉鸡、鹅、大鼠、断奶仔猪、湖羊的肾组织蛋白溶液。通过 WB 法鉴定鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体特异性, 电泳和转印等具体方法同 1.6。

DF-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的达尔伯克改良 Eagle 培养基中 (DMEM),  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中贴壁培养。细胞学定位采用免疫荧光方法进行, 参照陈云雨等<sup>[7]</sup>方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 中国麻鸭 ACE2 基因的 PCR 扩增

如图 1 所示, 在鸭心脏、肝脏、空肠和回肠组织中均有单一条带, 且条带大小为 2 435 bp 左右, 与鸭 ACE2 基因大小一致。



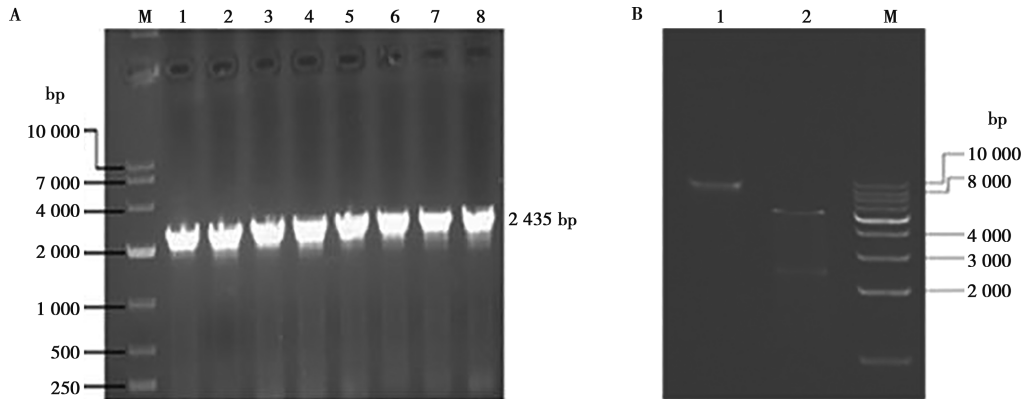
M. DL10000 Marker; 1~4. 分别为心脏、肝脏、空肠、回肠组织样品。

图 1 鸭 ACE2 基因的 PCR 扩增

## 2.2 pET32-ACE2 重组质粒的鉴定

PCR 检测显示, 1~8 号阳性菌落扩增产物均为 2 435 bp, 与预期一致 (图 2A)。酶切验证中, *Bam*H I 单酶切产生 8 300 bp 条带, 与载体

(5 896 bp) 和目的基因 (2 435 bp) 总和相符; 双酶切后出现 5 896 bp 和 2 435 bp 这 2 条带, 分别对应载体和目的基因 (图 2B), 结果证实鸭 pET32a-ACE2 重组质粒构建成功。



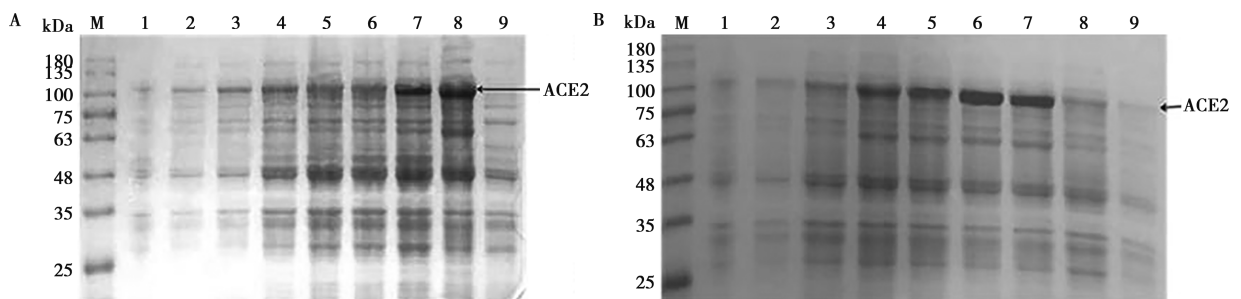
A. 菌液 PCR, M 为 DL10000 Marker, 1~8 为阳性菌落; B. 重组质粒酶切, M 为 DL10000 Marker, 1 为 pET32a-ACE2 重组质粒 *Bam*H I 单酶切, 2 为 pET32a-ACE2 重组质粒 *Bam*H I、*Hind*III 双酶切。

图 2 鸭 pET32a-ACE2 重组载体的鉴定

## 2.3 IPTG 诱导时间和浓度的优化

如图 3 所示 IPTG 可诱导 pET32a-ACE2 重组蛋白表达, 且表达量随诱导时间延长而增加, 在 12 h

时达到最高; 同时, 蛋白表达量随 IPTG 浓度升高而增加, 2 mmol/L 时已接近最大。最终优化条件为 2 mmol/L IPTG 诱导 12 h。



A. IPTG 诱导表达时间的优化, M 为标准蛋白分子 Marker, 1~9 为 1 mmol/L IPTG 分别诱导表达重组蛋白 0、2、4、6、8、10、12、14、16 h; B. IPTG 诱导表达浓度的优化, M 为标准蛋白分子 Marker, 1~9 为 IPTG 诱导表达浓度 0、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 mmol/L。

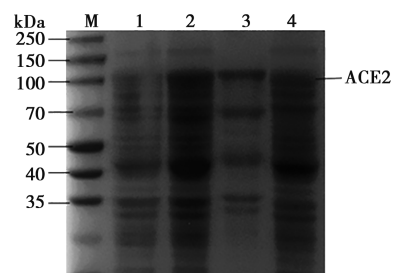
图 3 IPTG 诱导时间和浓度的优化情况

## 2.4 鸭 ACE2 重组蛋白表达形式的鉴定

如图 4 可见, 与未破碎菌液相比, 破碎后菌液中 ACE2 的含量更高, 且主要存在于破碎菌液沉淀中, 说明 pET-32a-ACE2 质粒表达的 ACE2 重组蛋白主要以包涵体形式存在。

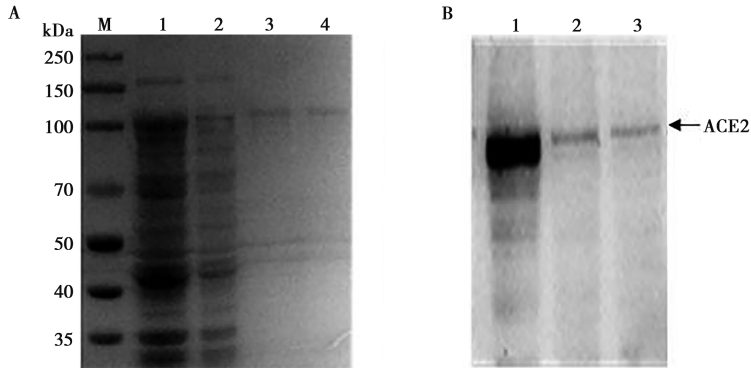
## 2.5 鸭 ACE2 重组蛋白的纯化

选用 KCl 染色法进行切胶纯化鸭 ACE2 重组蛋白。由图 5 所示, 通过 SDS-PAGE 和 WB 鉴定, 与未纯化的鸭 ACE2 重组蛋白相比, KCl 切胶纯化法获得了纯度较高的鸭 ACE2 重组蛋白。



M. 标准蛋白分子 Marker; 1~4. 依次为破碎前菌液、破碎后菌液、破碎后菌液沉淀、破碎后菌液上清液。

图 4 ACE2 重组蛋白表达形式的鉴定



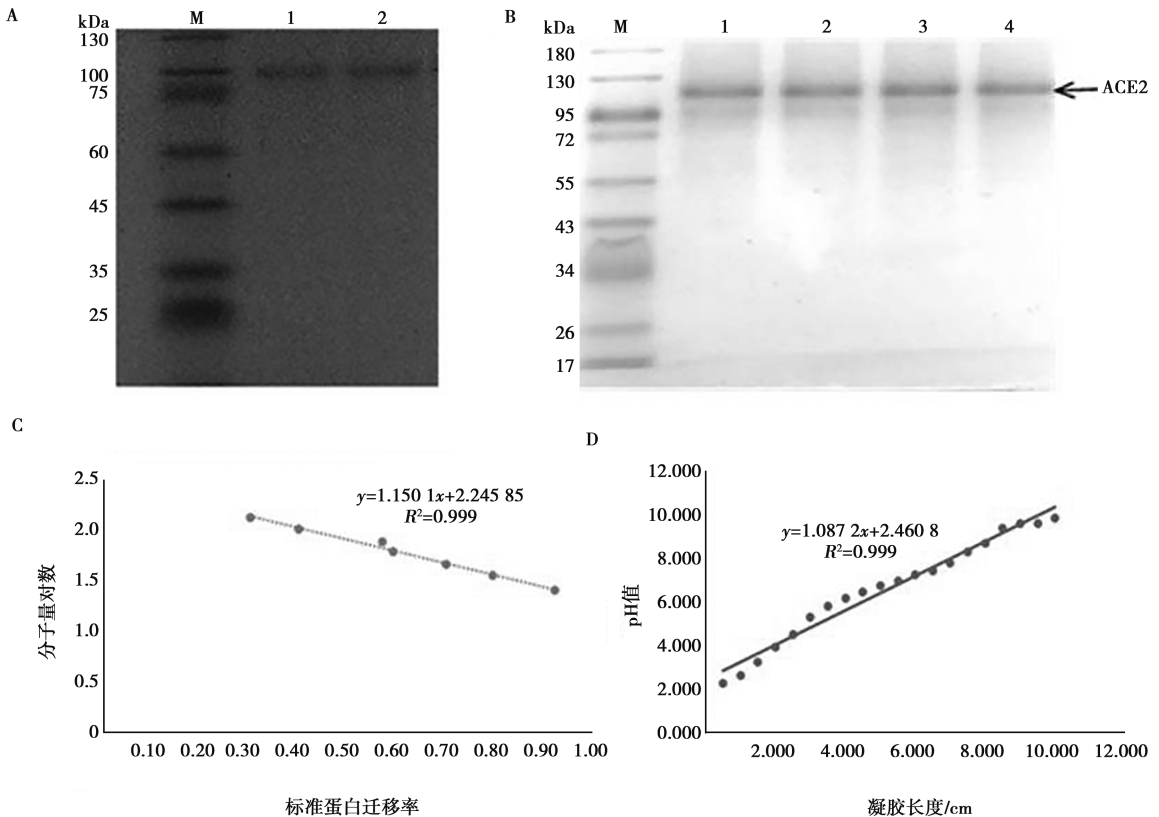
A. KCl 切胶回收纯化产物的 SDS-PAGE, M 为标准蛋白分子 Marker, 1 为诱导表达后超声破碎的 pET-32a-ACE2 重组表达菌, 2 为诱导表达后未破碎的 pET-32a-ACE2 重组表达菌, 3 为 KCl 切胶回收纯化后的 ACE2 重组蛋白, 4 为 KCl 切胶回收纯化后反复冻融的 ACE2 重组蛋白; B. 切胶纯化产物的 WB, 1 为未纯化 ACE2 重组蛋白, 2~3 为 KCl 切胶回收纯化后的 ACE2 重组蛋白。

图 5 切胶纯化 ACE2 重组蛋白的鉴定

### 2.6 鸭 ACE2 重组蛋白部分性质的鉴定

由图 6 可知, 纯化的鸭 ACE2 重组蛋白在非变性和变性 SDS-PAGE 中均呈单一条带, 表明其为单一肽链结构, 与跨膜蛋白预测一致。通过半对数坐标

法, 得出标准蛋白分子量标准曲线, 得出该鸭 ACE2 重组蛋白的分子量 = 109.81 kDa ≈ 110 kDa。以 pH 值为纵坐标, 凝胶长度为横坐标对应作出曲线, 得出该鸭 ACE2 蛋白等电点 pI = 5.61。



A. 非变性 PAGE 分析纯化后鸭 ACE2 重组蛋白, M 为标准蛋白分子 Marker, 1、2 为纯化后鸭 ACE2 重组蛋白; B. SDS-PAGE 分析纯化后鸭 ACE2 重组蛋白, M 为标准蛋白分子 Marker, 1~4 为纯化后鸭 ACE2 重组蛋白; C. 分子量半对数曲线; D. pH 值梯度标准曲线。

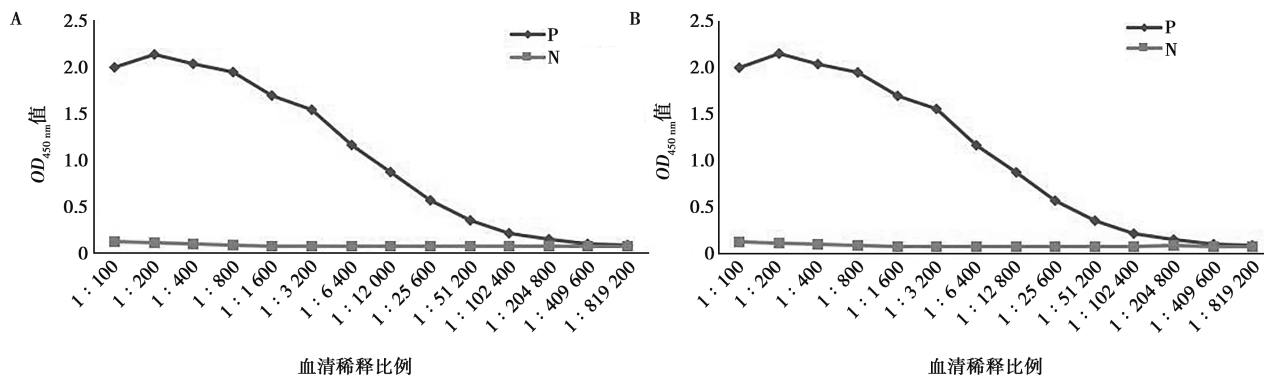
图 6 鸭 ACE2 重组蛋白部分性质的鉴定

### 2.7 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体效价的测定

由表 2 所示, 2 只免疫小鼠的蛋白免疫抗体都呈现阳性, 其 P/N 值皆大于 2。如图 7 所示, 阳性血清的  $OD_{450\text{ nm}}$  值随着血清稀释倍数的增大总体呈下降趋势, 阴性血清的  $OD_{450\text{ nm}}$  值变化不显著。当稀释倍数达到 1 : 12 800 时, 阳性血清的  $OD_{450\text{ nm}}$  值接近 1, 说明此抗血清的效价为 1 : 12 800。

表 2 抗体效价判定

项目	阳性 1 号	阳性 2 号	阴性 1 号	阴性 2 号
$OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.876 5	0.936 0	0.071 5	0.073 5
P/N	12.258 7	12.734 7	/	/



A. 1 号鼠; B. 2 号鼠。

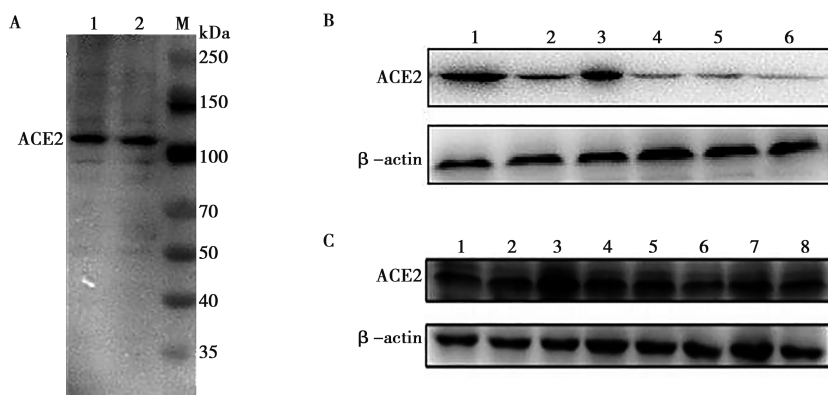
图 7 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体效价检测

### 2.8 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体的鉴定

#### 2.8.1 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体 WB 鉴定

如图 8 所示, 该抗体能够特异性识别原核重组 ACE2 蛋白及鸭肝脏组织中的内源 ACE2 蛋白, 尽管二者理论分子量存在差异, 但它们在 SDS-PAGE 中均迁移至约 110 kDa 位置, 其迁移行为符合该类蛋白

常见的异常迁移特征。进一步检测显示, 该抗体可识别麻鸭、白羽肉鸡和鹅肾脏组织中的 ACE2, 但与大鼠、仔猪及湖羊肾脏组织中的 ACE2 反应相对较弱, 提示其具有一定的种属特异性。组织分布分析发现, ACE2 在麻鸭心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及肠道 (十二指肠、空肠、直肠) 中皆有表达。



A. 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体与纯化后的鸭 ACE2 重组蛋白及鸭肝脏组织蛋白的特异性结合鉴定, M 为标准蛋白分子 Marker, 1 为 KCl 切胶回收纯化的鸭 ACE2 重组蛋白, 2 为鸭肝脏组织 ACE2 蛋白; B. ACE2 多克隆抗体在不同物种中鉴定结果, M 为标准蛋白分子 Marker, 1~6 依次为麻鸭、鹅、白羽肉鸡、大鼠、断奶仔猪和湖羊肾脏组织; C. 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体鉴定 ACE2 在麻鸭体内的分布表达, 1 为心脏, 2 为肝脏, 3 为脾脏, 4 为肺脏, 5 为肾脏, 6 为十二指肠, 7 为空肠, 8 为直肠。

图 8 ACE2 多克隆抗体特异性验证及组织分布

#### 2.8.2 鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体的免疫荧光鉴定

图 9 结果显示, 该鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体可以

检测出 ACE2 在 DF-1 细胞中的表达 (绿色荧光), 并发现 ACE2 蛋白大多分布在细胞膜上。

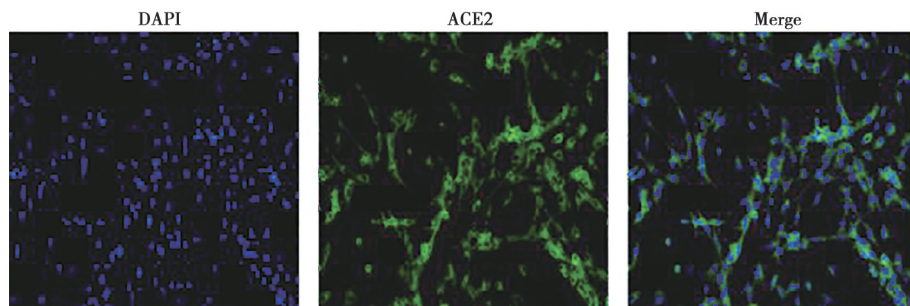


图9 DF-1 细胞中 ACE2 的分布表达 (200×)

### 3 讨论

自 2000 年首次克隆了人 ACE2 全长 cDNA 并报道了其序列以来, 小鼠等哺乳动物和啮齿等动物的 ACE2 基因相继被克隆。对于禽类的研究相对滞后, 尤其缺乏对鸭等水禽 ACE2 基因的基础研究资料。杨国良等<sup>[8]</sup>首次在大肠杆菌中成功克隆表达具有良好免疫原性的 ACE2 重组蛋白, 且证明丧失酶活性的 ACE2 仍保持 SARS-CoV 的受体功能。杨维维等<sup>[9]</sup>利用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 原核表达系统, 获得重组 ACE2 蛋白作为抗原免疫大鼠, 获得山羊 ACE2 多克隆抗体。周潇等<sup>[10]</sup>通过同种方法制备了猪 ACE2 的重组蛋白, 并使用该重组蛋白制备了特异性较好的 ACE2 多克隆抗体。本研究首次成功构建了鸭重组原核表达体系, 获得了鸭源 ACE2 重组蛋白, 制备获得了较高特异性的鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体, 并发现, 制备的鸭 ACE2 多克隆抗体可灵敏检测鸡、鸭、鹅组织中 ACE2 蛋白, 但对大鼠、仔猪和湖羊组织 ACE2 蛋白反应较弱。

ACE2 作为 RAS 系统的关键因子以及冠状病毒进入体内的受体, 对于其在不同组织中的分布以及含量研究有助于了解其在不同动物的不同组织中的特殊功能。本研究采用免疫荧光技术, 利用制备的鼠抗鸭 ACE2 多克隆抗体证实 ACE2 主要分布在 DF-1 细胞的细胞膜上, 这一结果与哺乳动物中 ACE2 亚细胞分布特征一致<sup>[11-12]</sup>。进一步免疫印迹分析显示, 鸭 ACE2 在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠道组织内广泛分布, 其分布模式与人和鼠的 ACE2 相似<sup>[13]</sup>。作为 RSA 系统的核心成员, ACE2 通过降解 AngII 转化为 Ang1-7, 参与维持血压和体液平衡, 并发挥抗炎及器官保护作用。其在心脏、肾脏、肺等组织中广泛表达, 进一步凸显了 ACE2 对全身稳态的调控功能。基于 ACE2 重要的生物学意义, 针对其特异性抗体的开发成为研究 ACE2 的关键工具。本研究成功构建了中国麻鸭 ACE2 的原核表达系统, 获得了鸭 ACE2 重组蛋白及鸭源 ACE2 多克隆抗体。证实 ACE2

在鸭体内的广泛分布, 这也表明其可能在鸭体内扮演着重要角色。本研究结果为阐明 ACE2 在鸭体内的生物学功能奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] DONOGHUE M, WAKIMOTO H, MAGUIRE C T, et al. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35 (9): 1043-1053.
- [2] SU C, LI C, HU X, et al. Association between ACE2 and lung diseases [J]. *Infect Drug Resist*, 2024, 17: 1771-1780.
- [3] RODRIGUES PRESTES T R, ROCHA N P, MIRANDA A S, et al. The anti-inflammatory potential of ACE2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis: evidence from basic and clinical research [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18 (11): 1301-1313.
- [4] OUDIT G Y, PENNINGER J M. Recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 as a new renin-angiotensin system peptidase for heart failure therapy [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2011, 8 (3): 176-183.
- [5] 倪菊华. 生物化学与分子生物学实验教程 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 117-119.
- [6] 纪晓霞. 鸡血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 的克隆表达及多克隆抗体的制备与鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [7] 陈云雨, 牛夏忆, 李森, 等. 大肠杆菌 Fts Z 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *生物工程学报*, 2019, 35 (6): 1117-1125.
- [8] 杨国良, 费小战, 陈焕春, 等. SARS 病毒受体 ACE2 的克隆、原核表达及其功能区鉴定 [J]. *病毒学报*, 2006(2): 118-122.
- [9] 杨维维. 山羊血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 的克隆表达及抗体制备 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [10] 周潇, 王换换, 伍钢, 等. ACE2 缓解乳房链球菌感染牛乳腺上皮细胞的炎性损伤及其机制研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2025, 48 (5): 1108-1118.
- [11] LI S, LI Y, XU H, et al. ACE2 attenuates epithelial-mesenchymal transition in MLE-12 cells induced by silica [J]. *Drug Devel Ther*, 2020, 14: 1547-1559.
- [12] CHIOCCHETTI R, GALIAZZO G, FRACASSI F, et al. ACE2 expression in the cat and the tiger gastrointestinal tracts [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 514.
- [13] CHEN Y Y, ZHANG P, ZHOU X M, et al. Relationship between genetic variants of ACE2 gene and circulating levels of ACE2 and its metabolites [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2018, 43 (2): 189-195.