



鲤 irisin 多克隆抗体的制备及应用

职韶阳, 杨丽萍, 秦超彬, 闫潇, 张文蕾,
刘茗宇, 赵梦娟, 聂国兴*
(河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为进一步研究鱼类糖代谢与鸢尾素 (irisin) 之间的关系, 亟需制备 irisin 抗体并检测其应用可靠性。本实验通过构建 Rosetta-irisin 表达载体, 经蛋白纯化、透析、超滤后免疫小鼠, 获得相应多克隆抗体并检测其特异性和抗体效价。建立 irisin 检测方法, 检测口服葡萄糖耐量 (OGTT)、RNAi 实验后鲤血清 irisinA 和 irisinB 的含量变化。免疫荧光检测鲤脑、肠道、心脏、肝胰脏 irisin 的表达及 OGTT 后, 检测上述组织 irisin 含量变化。检测鲤肌细胞分化前后 *FNDC5* mRNA 表达差异及 irisin 含量变化。结果显示, Rosetta-irisin 表达载体在 IPTG 诱导 4 h 对鲤 irisinA/B 蛋白表达较 BL21-irisin 表达载体提高 2.3/1.6 倍; irisinA 和 irisinB 抗体效价分别为 9.0×10^4 和 2.7×10^5 , 不存在交叉反应, 可分别对鲤血清 irisinA 和 irisinB 进行测定; OGTT 后, irisinA 和 irisinB 呈现出不同的合成变化; RNAi 后, irisin 含量显著降低; 免疫荧光结果显示, irisin 在脑中表达最高, 肝胰脏次之, 心脏、肠道中相对较少; OGTT 后, 脑、肠道、心脏和肝胰脏中 irisinA 和 irisinB 荧光强度显著增加。荧光定量表达分析与免疫荧光结果显示, 鲤肌细胞分化后, *FNDC5* 和 irisin 含量显著降低。综上, 本实验制备了高亲和力和特异性的鲤 irisinA 和 irisinB 抗体, 并检测其应用可靠性。该抗体的获得为系统研究 irisin 对鲤糖代谢的调控机制奠定基础。同时, 鲤 irisin 检测方法可普遍用于其他鱼类 irisin 蛋白质水平的定量研究。

关键词: 鲤; irisinA; irisinB; 多克隆抗体; 糖代谢; 肌细胞

中图分类号: Q78; S 917.4

文献标志码: A

近年来水产养殖业发展迅猛, 1989 年至今中国的水产品产量一直居于世界首位^[1-2]。蛋白质成本是水产饲料成本的重要组成部分, 有研究表明, 在饲料中添加适宜水平的糖类可以达到节约蛋白质, 降低养殖成本的作用^[3]。但是鱼类对糖类的利用能力较弱, 鱼类天生具有糖不耐受性, 摄糖过多会导致持续的高血糖状态, 属于典型的糖尿病体质^[4-5], 因此, 鱼类如何维持机体葡萄糖代谢平衡一直是一个值得重视的问题^[6]。内分泌调节

在维持机体糖稳态中发挥着重要作用^[7]。在人类中, 激素不仅可以直接调节葡萄糖摄取、储存和释放, 也能通过对其他葡萄糖调节的重要激素如胰岛素和胰高血糖素进行间接调节, 从而达到维持机体葡萄糖稳态的目的^[8]。2012 年鸢尾素 (irisin) 被鉴定为肌肉因子, 并被证明具有调节糖代谢的功能, 运动后产生的 PGC-1 α 介导肌肉组织产生 *FNDC5*, 酶切后产生 irisin^[9]。随着深入研究, 哺乳动物中 irisin 在维持葡萄糖稳态和促进产

收稿日期: 2022-07-24 修回日期: 2022-09-21

资助项目: 国家自然科学基金 (31872581, 31902384, 31902386); 中原千人计划河南省中原科技领军人才 (204200510025); 河南师范大学优秀科技创新团队支持计划 (2020TD02); 河南省现代农业产业技术体系专项 (HARS-22-16-G2)

第一作者: 职韶阳 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: Shaoyang_Zhi@126.com

通信作者: 聂国兴, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: niegx@htu.cn



热等方面的生理功能逐渐明晰^[10]。研究表明, irisin 可以在人体中诱导成熟脂肪细胞 GLUT4 的表达, 提高葡萄糖摄取量^[11]; 在离体环境下, 使用重组 irisin (50 nmol/L) 处理原代人骨骼肌细胞 1 h 能显著增加对葡萄糖和脂肪酸的摄取, 具有增强糖酵解, 抑制糖异生的作用, 同时抑制糖原分解相关基因的表达^[12]。

在鱼类中, irisin 与糖代谢的相关报道较少。2021 年, 鲤 (*Cyprinus carpio*) irisin 作为一种糖代谢调节因子被克隆、表征, 并展开初步的糖代谢功能研究^[13]。2022 年, 阐明 irisin 能够通过 AMPK 和 PI3K/Akt 信号通路调控鲤肝糖代谢^[14]。相关研究大多从转录水平出发, 研究不够深入全面, 无法对鱼体内 irisin 含量进行定量检测, 极大地制约了 irisin 对鲤糖代谢调节的深入研究。在哺乳动物中, 除了肌肉组织和心肌之外, 在大脑和皮肤、肝脏等处均检测到 irisin^[15-16]。研究报道哺乳动物 irisin 的循环水平并不相同, 甚至有显著差异。目前已有的检测阈值在人 (*Homo sapiens*) 血清或血浆中的浓度跨度很大, 为 0.01~2 000.00 ng/mL^[17-19]。FNDC5 是由一个 N 端的信号肽、一个纤连蛋白 III 型结构域、一个疏水的跨膜结构域以及锚定在膜上的 C 末端结构域组成^[9], 实验所检测到的 irisin 可能是全长的 FNDC5 或是其他的可以发生某些非特异性结合的蛋白质^[20], 血清 irisin 的准确检测方法亟需建立和规范^[21-23]。血清 irisin 含量无法准确测定, 同样制约了水产养殖动物糖代谢的深入研究。

因此, 本研究拟使用原核重组鲤 irisinA 和 irisinB, 免疫 NIH 阴性小鼠 (*Mus musculus*), 获得鲤 irisinA 和 irisinB 多克隆抗体。分别验证其特异性后, 检测抗体效价, 并以此抗体使用酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 法检测经过口服葡萄糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 或 siRNA 干扰后鲤血清中 irisinA 和 irisinB 的含量变化, 免疫荧光检测 irisin 相对分布以及葡萄糖耐量后脑、心脏、肝胰脏、肠道蛋白质水平 irisin 的表达变化, 检测鲤肌细胞分化前后 irisin 含量, 为深入研究水产养殖动物糖代谢提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株、载体及实验对象 DH5 α /BL21

(DE3)/Rosetta (北京索莱宝科技有限公司); pET21a 载体为本实验室保存; 实验对象为健康鲤, 体长 (12.0 \pm 1.0) cm, 体重 (37.00 \pm 1.25) g, 购自河南省延津水产养殖基地, 养殖于河南师范大学水产养殖基地, 将鲤驯化 2 周后, 转移至 300 L 塑料罐的循环水养殖系统中, 光/暗为 12/12。在 8:30、13:30 和 18:30 饱食投喂商品饲料 (河南通威饲料有限公司)。水质指标和养殖环境: DO (5.8~6.2), 温度 (27 °C)、pH (7.2~7.4) 和氨基氮 (<0.02 mg/L); NIH 阴性实验鼠购自华兰生物工程股份有限公司。实验过程中操作人员严格遵守实验动物饲养管理使用指南和伦理规范, 并按照河南师范大学实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

实验试剂 TRIzol、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit (with DNA eraser)、高保真酶 Prime STAR® HS DNA Polymerase、pMD19-T vector (TaKaRa, 日本); 胶回收试剂盒 Quick Gel Extraction Kit (江苏康为世纪生物科技股份有限公司); 2 \times PCR mix (Abcam, 英国); 质粒提取试剂盒 Omega EZNA plasmid mini kit I (Omega, 美国); 氨苄青霉素钠, 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 29 : 1 以及 ECL 化学发光试剂盒均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PVDF 膜 (Millipore, 美国); 荧光二抗 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 总 RNA 的提取及反转录

RNA 的提取参考文献^[14], 以 1 mL TRIzol 溶液浸没组织, 匀质研磨仪 50 Hz 频率低温振荡至组织破碎; 12 000 \times g, 4 °C 离心 5 min, 吸取 800 μ L 上清液, 加入 200 μ L TRIzol 补齐后, 以 5 : 1 (体积比) 比例加入氯仿, 剧烈振荡后, 静置 10 min, 12 000 \times g, 4 °C 离心 15 min; 吸取上清液, 以 1 : 1 (体积比) 比例加入异丙醇, 轻柔混匀后, 静置 10 min, 12 000 \times g, 4 °C 离心 10 min; 弃去上清液, 干燥后以 DEPC 水溶解 RNA, Nanodrop 2 000 (Thermo, 美国) 评估 RNA 质量及浓度, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 完整度。按照去基因组反转录试剂盒说明书对 RNA 进行反转录, 获得 cDNA。

1.3 鲤 irisinA、irisinB 基因扩增、载体构建、原核表达及表达条件的优化

鲤 irisinA、irisinB 基因扩增、载体构建
鲤 irisinA、irisinB 基因的开放阅读框 (ORF) 区的扩增、载体构建参考文献^[13], 即根据 irisinA 和

irisinB 的 ORF 区设计相应序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件对序列进行分析, 添加保护碱基、6×HIS 标签以及特异性酶切位点, 使用高保真酶对 ORF 区进行扩增, 扩增程序参考文献^[13]。使用胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段, 与 pMD19-T 16 °C 过夜连接; 通过热激法将连接产物导入感受态细胞 DH5α 中, 将混合液均匀涂布至含氨苄的 LB 固体培养板上, 37 °C 过夜培养; 随后挑取阳性克隆进行 PCR 验证, 对扩增大小正确的阳性克

隆进行扩大培养, 提取质粒并测序验证。

测序后, 使用 ClustalW2 软件对 irisinA、irisinB 质粒进行氨基酸序列比对并检测其相似度。将目的基因和 pET21a 载体分别使用 *Not* I-HF 和 *Eco*R I-HF (NEB, 美国) 进行双酶切, 37 °C 酶切 8 h。1.0% 琼脂糖凝胶中纯化质粒, 产物经回收纯化后, 使用 T₄ 连接酶分别构建 pET21a-irisinA、pET21a-irisinB 表达载体, 使用 BL21 (DE3) 以及 Rosetta 作为表达菌株, 引物序列及相关信息如表 1 所示。

表 1 引物序列信息

Tab. 1 Information of primer sequences

基因 genes	引物序列 primer sequences	内切酶 restriction enzyme	片段大小/bp fragment size	表达载体 expression vector	感受态细胞 competent cells	融合蛋白大小/ku fusion protein size	目的 purpose
<i>irisinA-F</i>	CGGA <u>ATTC</u> CCATCATCATCATCATCATCAT GAAAGTTTGGATGCTC	<i>Eco</i> R I	354	pET21a	Rosetta	14.90	原核表达
<i>irisinA-R</i>	ATAGTTTAGCGGCCGCTCATTCTTCC ATGGTCAC	<i>Not</i> I			(DE3)		载体构建
<i>irisinB-F</i>	CGGA <u>ATTC</u> CCATCATCATCATCATCATCAT GACAGTTTATCTGCTC	<i>Eco</i> R I	354	pET21a	Rosetta	14.94	原核表达
<i>irisinB-R</i>	ATAGTTTAGCGGCCGCTTACTCTCTCC ATGGTCAC	<i>Not</i> I			(DE3)		载体构建
<i>qFNDC5a-F</i>	AACCGCTGCGTTTCAAAAACC		71				<i>FNDC5a</i> qPCR
<i>qFNDC5a-R</i>	CATGGTCACTTCGTCTTTGCTC						
<i>qFNDC5b-F</i>	TCATTGGGTTTGCCATCACC		97				<i>FNDC5b</i> qPCR
<i>qFNDC5b-R</i>	TCCCACAATGCACATGAACG						

注: 下划线部分分别为 *Eco*R I 和 *Not* I 的酶切位点; BL21/Rosetta 菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体(如 pET 系列)的基因。普通大肠杆菌没有 t7 RNA 聚合酶, 所以不能表达载体上的基因。
Notes: The underlined parts were the restriction sites of *Eco*R I and *Not* I, respectively; the BL21/Rosetta(DE3) strain was used to efficiently express the gene cloned in an expression vector containing the bacteriophage T7 promoter, such as the pET series. Ordinary *E. coli* does not have t7 RNA polymerase and therefore can not express those vector genes.

重组 irisin 蛋白的原核表达及表达条件的优化 使用热激法将重组质粒分别转化至 BL21 (DE3) 和 Rosetta 中, 过夜培养, 从 LB 固体培养板上挑取阳性单克隆接种至 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀=0.6; 收集 1 mL 菌液离心 (10 000×g, 2 min, 4 °C), 加入 IPTG (1 mmol/L) 诱导蛋白表达, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 4 h, 分别取 1 mL BL21 表达菌液和 Rosetta 表达菌液, 选择表达量最高的表达载体, 用于后续蛋白表达实验。

重组 irisin 蛋白可溶性分析 菌液经 IPTG 诱导后 4 h, 离心 (10 000×g, 2 min, 4 °C), 按溶解缓冲液: LB 液体培养基=1:10 (体积比) 的比例加入 1 mol/L 尿素溶解缓冲液 (1 mol/L 尿素, 5 mol/L NaCl、81 mmol/L Na₂HPO₄、19 mmol/L NaH₂PO₄) 溶解, 在低温下对溶液进行超声破碎

(功率 600 W, 超声开 3 s, 关 3 s, 30 min)。破碎后离心 (4 °C, 6 500×g, 15 min), 离心后含有可溶性蛋白和少量包涵体蛋白溶于上清液, 沉淀均为包涵体蛋白。超速离心上清液 (4 °C, 12 000×g, 15 min), 收集上清液进行蛋白纯化, 记作“上清液”。包涵体蛋白以 6 mol/L 尿素溶解缓冲液 (6 mol/L 尿素、5 mol/L NaCl, 81 mmol/L Na₂HPO₄、19 mmol/L NaH₂PO₄) 溶解, 磁力搅拌 10 min, 离心 (4 °C, 12 000×g, 15 min), 收集上清液进行蛋白纯化, 记作“包涵体”, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。

重组 irisin 蛋白的纯化 纯化前, 用 0.45 μm 的过滤器过滤所有溶液。调节液体流速为 1 mL/min, 样品收集后冰上保存。简要步骤: ddH₂O (5 mL) 冲洗镍柱; 1 mol/L 溶解缓冲液 (10 mL) 平衡镍柱; 收集样品 (1 mL), 记作“未过柱液”; 上样, 收集

1 mL 液体, 记作“过柱液”; 1 mol/L 冲洗缓冲液 (1 mol/L 咪唑、5 mol/L NaCl、81 mmol/L Na_2HPO_4 、19 mmol/L NaH_2PO_4) (10 mL) 洗涤镍柱, 收集 1 mL 液体, 记作“冲洗液”; 7 mL 1 mol/L 洗脱缓冲液 (5 mol/L 咪唑、5 mol/L NaCl、81 mmol/L Na_2HPO_4 、19 mmol/L NaH_2PO_4) 洗脱蛋白, 收集 6 mL 液体, 记作“洗脱液”; ddH_2O (10 mL) 洗涤镍柱; 20% 乙醇封闭镍柱, 石蜡膜密封, 4 °C 保存镍柱。SDS-PAGE 分析收集的蛋白溶液。

重组 irisin 蛋白的透析及超滤 按照说明书对透析袋 (北京索莱宝科技有限公司) 进行清洗与激活, 使用透析袋将蛋白溶液转移至 1 L 含有 0.5 mol/L 尿素的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 4 °C 磁力搅拌 12 h; 将透析袋转移至 1 L 不含尿素的 PBS 中, 4 °C 磁力搅拌 12 h, 以去除重组蛋白溶液中的咪唑及尿素。向超滤离心管 (Thermo, 美国) 中加入 10 mL 超纯水, 离心 (5 000×g, 4 °C, 10 min), 清洗并激活超滤离心管; 将透析后的样品加入超滤离心管中, 离心 (5 000×g, 4 °C, 2 h), 充分吹打悬浮, 重复离心直至上层液体剩余约 1 mL; 取 100 μL 超滤液进行 SDS-PAGE 电泳验证, 其余溶液置于 -80 °C 保存。

1.4 多克隆抗体的制备

免疫动物 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 进行蛋白浓度测定, 加入 PBS 将蛋白浓度调至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以 1 : 1 (体积比) 比例混匀蛋白溶液与弗氏佐剂 (Sigma, 美国), 达到“油包水”的乳化状态, 采用皮下多点注射 (4~6 个点) 的方法免疫 NIH 阴性鼠。每 10 天免疫 1 次, 共 5 次免疫 (注意弗氏完全佐剂用于初次免疫, 加强免疫则使用弗氏不完全佐剂)。

血清的收集以及抗体效价的检测 间接 ELISA 法用于抗体效价检测, 以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白溶液用于包被酶标板, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液为空白对照, 4 °C 过夜包被; 使用 10% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h, 随后加入不同稀释度的抗血清 (1 : 1.0×10^2 、1 : 1.0×10^3 、1 : 1.0×10^4 、1 : 3.0×10^4 、1 : 9.0×10^4 、1 : 2.7×10^5 、1 : 8.1×10^5 、1 : 2.4×10^6) 及阴性对照血清 (未免疫鼠血清), 37 °C 孵育 2 h, HRP 标记的羊抗兔二抗 37 °C 孵育 1 h, TMB 显色 30 min, 加入硫酸溶液后测定 $A_{450\text{nm}}$ 值。抗体效价以处理组/阴性对照的光吸收比值 ≥ 2 为标准, 最大稀释倍数即为抗血清效价。血液采集后室温

静置 4 h, 离心 (6 000×g, 4 °C, 10 min) 收集上清液。

1.5 鲤 irisinA、irisinB 抗体交叉反应验证

为验证 irisinA 和 irisinB 抗体的特异性和有效性, 进行抗体交叉验证实验。分别使用 irisinA 和 irisinB 抗体 (体积比 1 : 400) 同时孵育不同浓度 (1 000/500 ng) 的重组鲤 irisinA 或 irisinB 蛋白, Western blot 法检测抗体特异性。

1.6 葡萄糖耐量实验

选取 144 尾鲤, 随机分为两组 (生理盐水/葡萄糖灌喂组)。以 1.67 g/kg 体重 (BW) 灌喂生理盐水或葡萄糖。灌喂后 0、1、2、3、5 和 10 h, 尾静脉采血, 静置 4 h 后离心收集血清。

1.7 siRNA 干扰实验

选取 60 尾鲤随机分为对照组 (PBS)、无义 siRNA (Scramble) 组、siRNA-irisinA 组、siRNA-irisinB 组、siRNA-irisinA/irisinB 组, 每组 12 尾鱼。脑室注射 (*i.c.v.*) 方法参考文献^[14], 禁食 24 h 后, 以 PBS 配制 Scramble 和 siRNA; siRNA-irisinA 组、siRNA-irisinB 组以及 siRNA-irisinA/irisinB 组分别注射 siRNA-irisin 溶液 (10 ng/g BW), 对照组和无义 siRNA 组分别注射同等体积的 Scramble 溶液和 PBS 溶液。注射 24 h 后尾静脉取血, 静置 4 h 后离心收集血清。

1.8 鲤肌细胞的诱导分化

使用含 20% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 培养基传代第 40 代鲤肌细胞至 12 孔板, 每孔细胞数为 15 万, 28 °C, 5% CO_2 环境下培养。待其汇合后, 吸出培养基, PBS 浸洗, 记为“未分化” ($n=6$)。另一组更换培养基为含有 2% 马血清的 DMEM/F12 培养基, 待其形态发生变化后, 吸出培养基, PBS 浸洗, 记为“分化” ($n=6$)。爬片以 4% 多聚甲醛固定 15 min, 进行细胞免疫荧光实验。

使用含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基传代第 40 代肌细胞至 12 孔板, 每孔细胞数为 15 万, 待其汇合后, 对照组培养基仍使用 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基继续培养, 分化组更换培养基为含有 2% 马血清的 DMEM/F12 培养基, 分别诱导 2 和 3 d。诱导后, 吸出培养基, 使用 500 μL TRIzol 收集细胞, 按照文献的方法提取 RNA 并鉴定其完整性^[14], 使用去基因组反转录试剂盒获取第一链 cDNA, 荧光定量 PCR (qPCR) 程序如前所

述^[13], 并采用 $2^{-\Delta\Delta C}$ 法分析基因表达^[24]。18S *rRNA* 作为内参基因, 实验重复2次, 以保证其准确性。

1.9 鲤血清中 *irisinA*、*irisinB* 含量的测定

ELISA 法检测血清中 *irisinA* 和 *irisinB* 的含量, 将血清与 $2\times$ 包被液以1:1(体积比)稀释后包被酶标板, 4℃过夜。一抗以1:2 000(体积比)稀释并加入至酶标板, 其他处理完全同“多克隆抗体的制备”部分。

1.10 多克隆抗体的免疫荧光检测

组织样品包埋与石蜡切片制作 简要步骤为: 4%多聚甲醛固定组织, 乙醇梯度脱水, 制片观察。具体操作: 将样品分别置于70%、80%、90%和无水乙醇中浸泡脱水30 min; 以1:1的比例配制无水乙醇:二甲苯混合液, 浸泡样品20 min至组织透明; 将样品浸泡于盛有石蜡溶液的68℃温浴盒中2 h; 将组织置于包埋盒中, 浸蜡凝固后4℃保存; 将蜡块裁切成四方体, 切片机固定切片, 将蜡片置于40℃蒸馏水中展片, 观察形态后使其贴附于载玻片上, 40℃烘片3 h, 4℃保存。

组织固定 取常规饲养及葡萄糖耐量前后鲤脑、心脏、肝脏和肠道组织, 经包埋与切片制作后进行免疫荧光检测。将载玻片依次置于二甲苯(15 min \times 2)、无水乙醇(3 min)、90%乙醇(3 min)、80%乙醇(3 min)、70%乙醇(3 min)中脱蜡和水化; 转移载玻片至PBS中洗涤15 min(5 min \times 3)。

细胞固定及透化 4%多聚甲醛固定15 min, PBS浸洗细胞15 min(5 min \times 3), 将细胞爬片转移至0.5%的TritonX-100(北京索莱宝科技有限公司)中透化。

免疫荧光 转移载玻片至3% H_2O_2 , 避光孵育20 min; PBS浸洗细胞15 min(5 min \times 3)。以1:200(体积比)比例稀释山羊血清, 孵育组织15 min; 重复洗涤步骤。以1:400(体积比)比例稀释 *irisin* 多克隆抗体, 4℃过夜孵育; 重复洗涤步骤。以1:800(体积比)比例稀释荧光二抗, 室温避光孵育1 h, 重复洗涤步骤。滴加DAPI, 室温避光孵育15 min, 重复洗涤步骤。使用抗荧光猝灭剂封片, 固定完成后观察组织。

1.11 数据分析

数据以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)的形式表

示, SPSS 18.0 软件用于数据统计学分析, 对于两组间数据分析, 采用 *t* 检验分析其是否具有显著差异, 单向 ANOVA 中 LSD 指标检测多组间数据分析, 概率小于 0.05 ($P < 0.05$) 被认为具有显著差异。免疫荧光组织观察后, 使用 Image J 对荧光强度进行定量, 统计后将荧光数值转换为平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)。

2 结果

2.1 *irisinA*、*irisinB* 基因扩增与原核表达载体的构建

按照先前的方法^[13], 分别从下丘脑和白肌的 cDNA 中克隆获得 *FNDC5a* 722 bp 和 *FNDC5b* 714 bp(图 1-a, b)。以其为模板, 使用 *irisinA* 和 *irisinB* 特异性引物分别进行扩增, 获得长度为 336 bp 的 *irisinA* 和 *irisinB* ORF 区(图 1-c, d), 均编码 112 个氨基酸, 预测蛋白大小约为 14.90 和 14.94 ku, 等电点分别为 4.62 和 4.46。

将克隆获得的 *irisinA* 和 *irisinB* 片段与 pET21a 进行连接, 获得 pET21a-*irisinA* (354 bp) 和 pET21a-*irisinB* (354 bp) 克隆载体, 双酶切处理后, 进行琼脂糖凝胶电泳分析, 泳道 1 和泳道 2 分别为质粒与酶切产物。结果显示, 目的片段 *irisinA* 和 *irisinB* 与表达载体 pET21a 成功连接(图 2-a, b)。

2.2 大肠杆菌原核表达系统制备重组 *irisinA*、*irisinB*

在先前的研究中^[13], 使用 BL21 对鲤 *irisin* 进行表达, 但其获得的蛋白量小、效率低, 因此本研究选用 Rosetta 表达株, 以优化蛋白表达条件。结果显示, 诱导表达后, 泳道 7/8 的 Rosetta 表达株对 *irisinA* 和 *irisinB* 的蛋白表达量高于泳道 5/6 的 BL21 表达株, 且两种表达株表达的 *irisinA* 和 *irisinB* 蛋白大小一致, 均约为 14.9 ku(图 3), 说明重组蛋白能够在 BL21 和 Rosetta 中表达, 在后续的研究中直接使用 *irisin*-pET21a 和 Rosetta 作为质粒和表达株进行蛋白表达实验。

蛋白表达后进行超声破碎, 离心后取上清液蛋白和包涵体蛋白进行 SDS-PAGE 检测。结果显示, 上清液中重组蛋白 *irisinA* 和 *irisinB* 约为 14.9 ku 且高效表达, 而包涵体蛋白含量较少(图 4)。

大量制备重组 *irisin* 蛋白并经过超声破碎后,

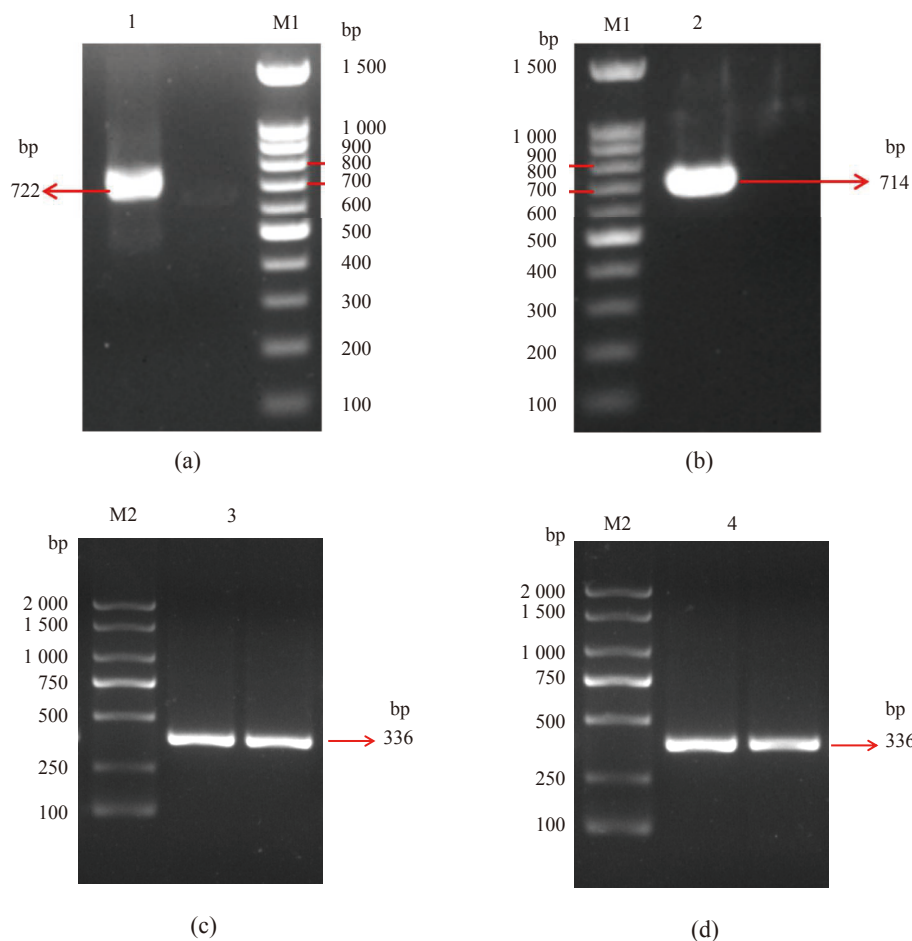


图 1 鲤 irisin PCR 克隆产物的电泳分析

(a) *fndc5a* PCR 产物, (b) *fndc5b* PCR 产物, (c) *irisinA* PCR 产物, (d) *irisinB* PCR 产物; 1-4, 相应 PCR 产物; M1. 100 bp DNA ladder; M2. DL2000 DNA marker.

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of PCR product of irisin

(a) the PCR product of *fndc5a*; (b) the PCR product of *fndc5b*; (c) the PCR product of *irisinA*; (d) the PCR product of *irisinB*; 1-4, corresponding PCR products; M1. 100 bp DNA ladder; M2. DL2000 DNA marker.

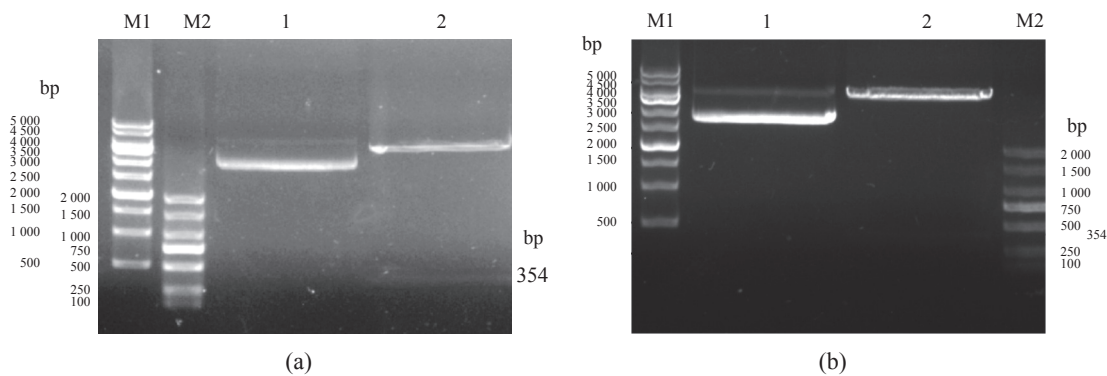


图 2 重组表达质粒的双酶切验证

(a) *irisinA*, (b) *irisinB*; 1. 重组质粒, 2. 重组质粒双酶切产物; M1. 500 bp ladder, M2. DL2000 marker.

Fig. 2 Double enzyme digestion of recombinant expression plasmid

(a) *irisinA*, (b) *irisinB*; 1. recombinant plasmid, 2. double digestion of recombinant plasmid; M1. 500 bp ladder, M2. DL2000 marker.

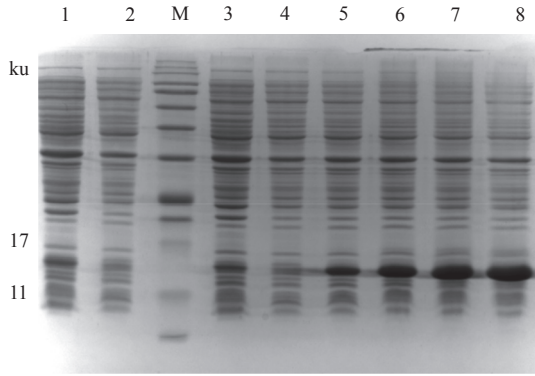


图 3 不同表达条件对 His-irisin 融合蛋白表达的影响
 M. 蛋白分子质量标准; 1. 未加 IPTG 诱导的 irisinA-BL21 合成组; 2. 未加 IPTG 诱导的 irisinB-BL21 合成组; 3. 未加 IPTG 诱导的 irisinA-Rosetta 合成组; 4. 未加 IPTG 诱导的 irisinB-Rosetta 合成组; 5. IPTG 诱导 4 h 的 irisinA-BL21 合成组; 6. IPTG 诱导 4 h 的 irisinB-BL21 合成组; 7. IPTG 诱导 4 h 的 irisinA-Rosetta 合成组; 8. IPTG 诱导 4 h 的 irisinB-Rosetta 合成组。

Fig. 3 His-irisin expression in *E. coli* under different conditions

M. protein molecular weight marker; 1. without IPTG inducement irisinA-BL21 group; 2. without IPTG inducement irisinB-BL21 group; 3. without IPTG inducement irisinA-Rosetta group; 4. without IPTG inducement irisinB-Rosetta group; 5. induced by IPTG irisinA-BL21 group; 6. induced by IPTG irisinB-BL21 group; 7. induced by IPTG irisinA-Rosetta group; 8. induced by IPTG irisinB-Rosetta group.

SDS-PAGE 检测蛋白大小及纯度。结果显示, 重组蛋白的纯度较好, 条带单一, 条带位于 11~17 ku, 大小正确 (图 4)。

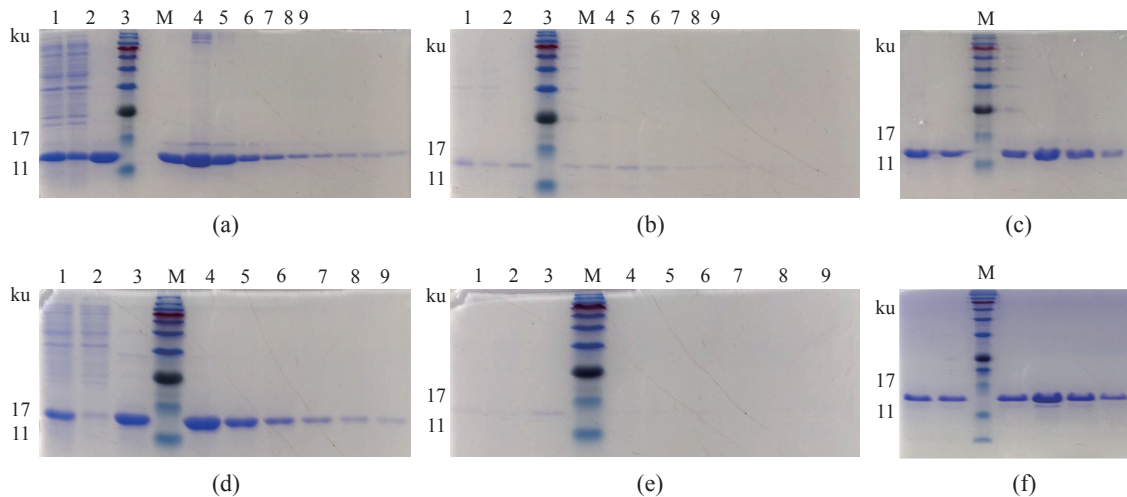


图 4 pET21a-irisin 融合蛋白的表达形式与纯化

(a) 上清液中 irisinA 蛋白, (b) 包涵体中 irisinA 蛋白, (c) 超滤后的 irisinA 蛋白, (d) 上清液中 irisinB 蛋白, (e) 包涵体中 irisinB 蛋白, (f) 超滤后的 irisinB 蛋白; M. 蛋白分子质量标准, 1. 未过柱液, 2. 过柱液, 3. 冲洗液, 4-9. 洗脱液。

Fig. 4 Type and purification of pET21a-irisin protein

(a) irisinA in supernatant; (b) irisinA in inclusion body; (c) irisinA after ultrafiltration; (d) irisinB in supernatant; (e) irisinB in inclusion body; (f) irisinB after ultrafiltration; M. protein molecular weight marker, 1. non-flow-through, 2. flow-through, 3. washing buffer, 4-9. elution buffer.

2.3 抗血清效价的检测

采用 ELISA 法检测血清中多克隆抗体的效价, 计算处理组/阴性对照组的光吸收比值。制备的 irisinA 和 irisinB 的多克隆抗体的效价分别在血清稀释至 9.0×10^4 和 2.7×10^5 时, 该比值大于 2 (表 2, 表 3)。因此, 所获得的 irisinA 和 irisinB 多克隆抗体的效价分别为 9.0×10^4 和 2.7×10^5 。

2.4 鲤 irisinA、irisinB 抗体交叉反应验证

氨基酸序列比对分析表明, irisinA 与 irisinB 氨基酸序列相似率为 77.68%, 同源性较高。Western blot 结果显示, irisinA 或 irisinB 多克隆抗体分别识别 irisinA 或 irisinB 蛋白, 二者之间不存在交叉反应, 抗体特异性良好 (图 5)。

2.5 血清 irisinA、irisinB 含量测定

生理盐水或葡萄糖灌喂后 0、1、2、3、5、10 h, 采血并检测血液中 irisinA 和 irisinB 水平。与对照组相比, 葡萄糖灌喂后 irisinA 和 irisinB 无明显变化 (图 6-a, b)。测定鲤基础水平 irisinA 含量约为 1.26 ng/mL, irisinB 的含量约为 1.15 ng/mL。

siRNA 注射实验结果显示, 对照组和 Scramble 组血清 irisinA 和 irisinB 含量无显著差异。注射 siRNA-A 和 siRNA-A、siRNA-B 共注射均能显著降低血清 irisinA 含量, 单独注射 siRNA-B 组与对照组和 scramble 注射组对血清 irisinA 含量无显

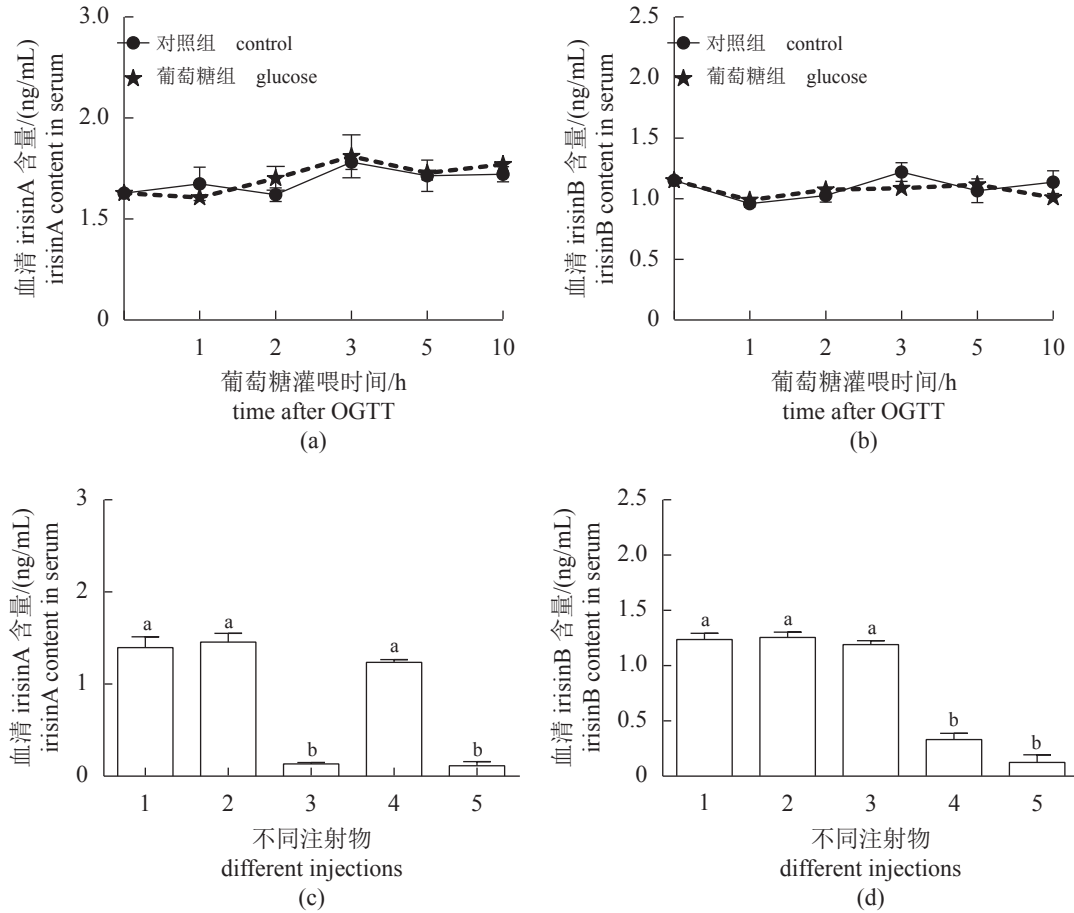


图 6 血清中 irisin 含量测定

(a) 葡萄糖耐量 (OGTT) 后不同时间血清 irisinA 含量变化; (b) OGTT 后不同时间血清 irisinB 含量变化; (c) 脑室注射 (*i.c.v*) siRNA 后血清 irisinA 含量变化; (d) 脑室注射 (*i.c.v*) siRNA 后血清 irisinB 含量变化。(c) 和 (d) 中, 1. scramble; 2. control; 3. siRNA-irisinA; 4. siRNA-irisinA; 5. siRNA-irisinA+ siRNA-irisinB; 不同字母表示不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 6 Determination of irisin in serum

(a) changes in serum irisinA at different time after OGTT; (b) changes in serum irisinB at different time after OGTT; (c) changes in serum irisinA after *i.c.v* injection of siRNA; (d) changes in serum irisinB after *i.c.v* injection of siRNA. In (c) and (d), 1. scramble; 2. control; 3. siRNA-irisinA; 4. siRNA-irisinA; 5. siRNA-irisinA+ siRNA-irisinB. The significant differences within each treatment group were represented by different letters ($P < 0.05$), the same below.

均有表达 (图版 I)。使用 ImageJ 软件统计分析荧光强度, 显示脑中的 irisin 含量最为丰富 (图版 I-1, 5), 肠道 (图版 I-2, 6) 和肝胰脏次之 (图版 I-4, 8), 心脏中 irisin 含量相对较少 (图 7)。

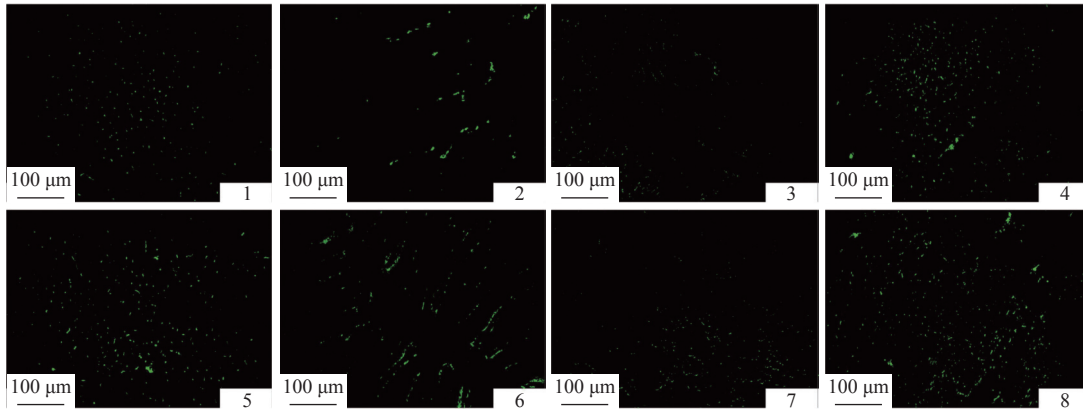
葡萄糖耐量 免疫荧光显示, OGTT 后 1 h, 脑、肝胰脏、心脏和肠道的 irisinA 荧光强度 (图版 II-4~6, 16~18, 28~30, 40~42) 与对照组相比均显著增加 (图版 II-1~3, 13~15, 25~27, 37~39)。OGTT 后, 脑、肝胰脏、心脏和肠道的 irisinB 荧光强度 (图版 II-10~12, 22~24, 34~36, 46~48) 与对照组相比显著增加 (图版 II-7~9, 19~21, 31~33, 43~45), 且在脑、肠道和肝胰脏中受葡萄糖

调节更为显著 (图 8-b)。这表明上述组织均可对葡萄糖作出响应, 可不同程度产生 irisinA 和 irisinB。

鲤肌细胞的诱导分化 在倒置显微镜下观察鲤肌细胞, 在使用 2% 马血清诱导后, 肌细胞形态变化并发生聚集 (图版 III-1~2)。免疫荧光实验表明, 在使用 2% 的马血清对鲤第 40 代肌细胞进行诱导后, 肌细胞中的 irisinA 和 irisinB 含量与未诱导时相比显著下降 (图版 III-3, 6, 9, 12)。

2.7 肌细胞分化前后 *FNDC5* 的表达变化

使用 2% 马血清诱导后, 肌细胞中的 irisinA 和 irisinB 含量与未诱导时相比显著下降 (图 9-a,



图版 I 免疫荧光检测 irisin 在组织中的相对分布

1~4. irisinA 相对含量, 5~8. irisinB 相对含量; 1、5. 脑, 2、6. 肠道, 3、7. 心脏, 4、8. 肝胰脏。

Plate I Relative distribution of irisin in tissues detected by immunofluorescence

1-4. the relative content of irisinA, 5-8. the relative content of irisinB. 1, 5. brain, 2, 6. intestine, 3, 7. heart, 4, 8. hepatopancreas.

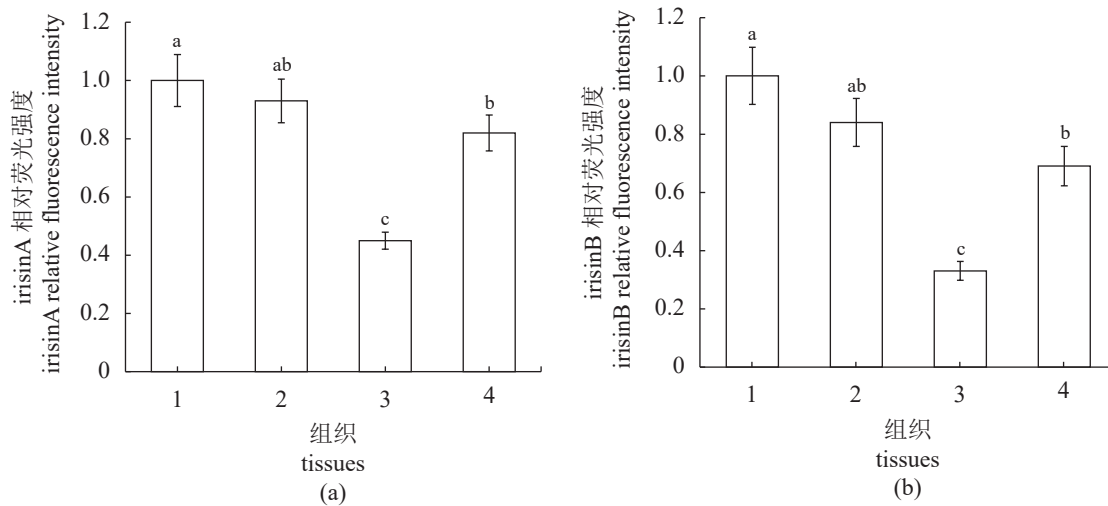


图 7 irisin 在组织中的相对分布

(a) irisinA 在各组织中的相对荧光强度, (b) irisinB 在各组织中的相对荧光强度; 1. 脑, 2. 肠道, 3. 心脏, 4. 肝胰脏。

Fig. 7 Relative distribution of irisin in tissues

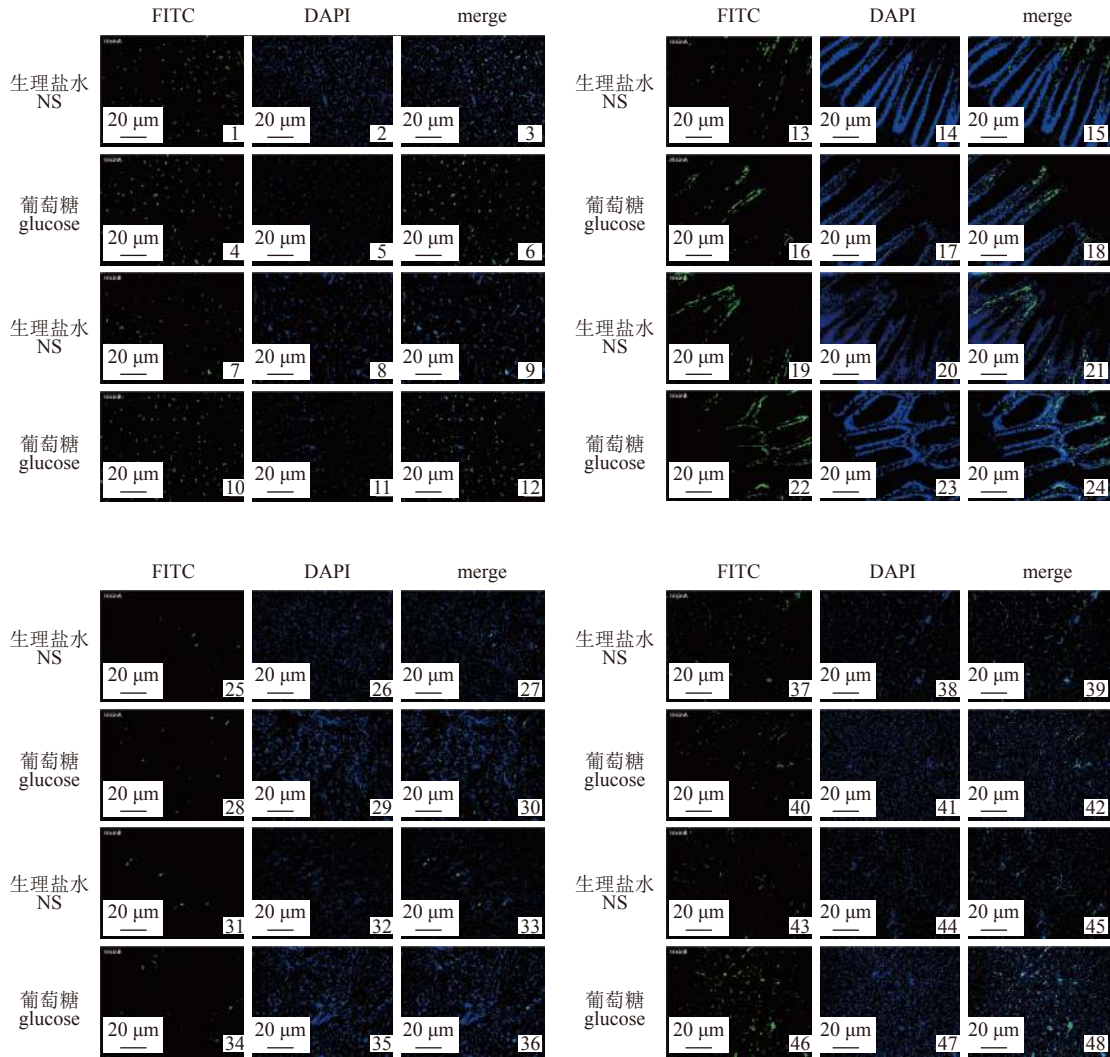
(a) relative fluorescence intensity of irisinA, (b) relative fluorescence intensity of irisinB; 1. brain, 2. intestine, 3. heart, 4. hepatopancreas.

b) *FNDC5a* 和 *FNDC5b* 的相对表达量与对照组相比显著下调 (图 9-c, d)。

3 讨论

Irisin 是一种广泛分布于全身各组织的肌肉和脂肪因子。在哺乳动物中, irisin 维持糖稳态的生理功能及作用已逐渐明晰, 其具有维持葡萄糖调节, 减轻肝脏的糖代谢压力, 改善葡萄糖摄取以及缓解内分泌和代谢紊乱的功能^[25-26]; 还可以通过活化蛋白激酶 (p38 MAPK), 上调线粒体解偶联蛋白 (UCP1) 来发挥作用, 有着减肥的功效^[27]; 其在改善心血管内皮功能、抗氧化、抗炎^[28-30] 等方

面均有作用。Irisin 的前体基因 *FNDC5* 在 2002 年已被发现^[31]。2012 年, Boström 等^[32] 报道过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1- α 介导肌肉 *FNDC5* 产生 irisin, 并证明耐力运动导致人类/小鼠体内 irisin 水平的增加。然而部分研究表明, 并非所有运动受试者都能够检测到 irisin 的显著变化^[22]。Pekala 等^[33] 发现肌肉 *PGC-1 α* 和 *FNDC5* mRNA 以及循环鸮尾素含量不会因运动而改变, 并且肥胖、空腹葡萄糖/胰岛素和 *FNDC5* mRNA 之间没有关系。哺乳动物中的 irisin 通常使用 EK-067-52 (phoenix pharmaceuticals, 英国)、EK-067-29 (phoenix pharmaceuticals, 英国)、AG-45A-0046 EK-k101 (adipogen, 韩国)、CSB-EQ027943HU



图版 II 免疫荧光检测葡萄糖耐量后 irisin 的相对变化

1~6 和 7~12 分别表示 OGTT 前后, irisinA 和 irisinB 在脑中荧光含量的变化; 13~18 和 19~24 分别表示 OGTT 前后, irisinA 和 irisinB 在肠道中荧光含量的变化; 25~30 和 31~36 分别表示 OGTT 前后, irisinA 和 irisinB 在心脏中荧光含量的变化; 37~42 和 43~48 分别表示 OGTT 前后, irisinA 和 irisinB 在肝胰脏中荧光含量的变化。FITC. 异硫氰酸荧光素; DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吲哚; merge. FITC 与 DAPI 的合并视野; NS. 生理盐水。

Plate II Relative changes of irisin after OGTT by immunofluorescence

Immunofluorescence of 1-6 and 7-12 showed the changes of irisinA and irisinB fluorescence content in brain before and after OGTT; 13-18 and 19-24 showed the changes of irisinA and irisinB fluorescence content in intestine before and after OGTT; 25-30 and 31-36 showed the changes of irisinA and irisinB fluorescence content in the heart before and after OGTT; 37-42 and 43-48 showed the changes of irisinA and irisinB fluorescence content in hepatopancreas before and after OGTT. FITC. fluorescein Isothiocyanate, DAPI. 4',6-diamidino-2-phenylindole, merge. the merging perspective of FITC and DAPI, NS. normal saline.

(cusabio, 美国) 和 SEN576Hu (cloud-clone, 美国) 等商品化试剂盒检测 [10, 23, 34], 检测精度为 0.01~2000.00 ng/mL 不等, 造成上述差异的原因可能与特异性抗体的缺失有关, 同时也与 irisin 存在糖基化、非糖基化以及二聚体等多种形式有关, 哺乳动物相关研究仍需开发能够检测不同形式 irisin 的单克隆抗体。正因为此, 鱼类 irisin 抗体的制备和检测方法问题亟待解决。

以往研究通过基因克隆, 获得鲤 *FNDC5a* 和 *FNDC5b* 基因亚型 [13]。在本研究中, 实验利用优化后的蛋白表达技术表达重组鲤 irisinA 和 irisinB, 与优化前相比, 蛋白产量增加 1.6 倍。原核表达的重组蛋白可能以包涵体或可溶形式存在, Rosetta-irisinA 和 Rosetta-irisinB 均以可溶形式存在于上清液中。由于 irisin 在人和小鼠之中 100% 同源, 高于胰岛素 (85%) 和胰高血糖素 (90%) [32],

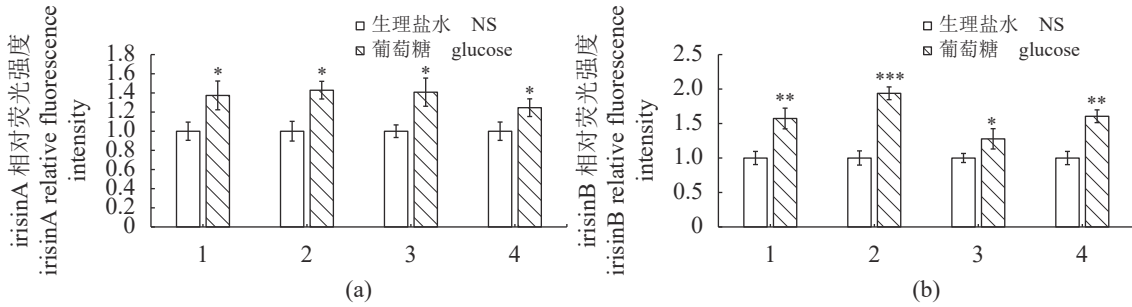
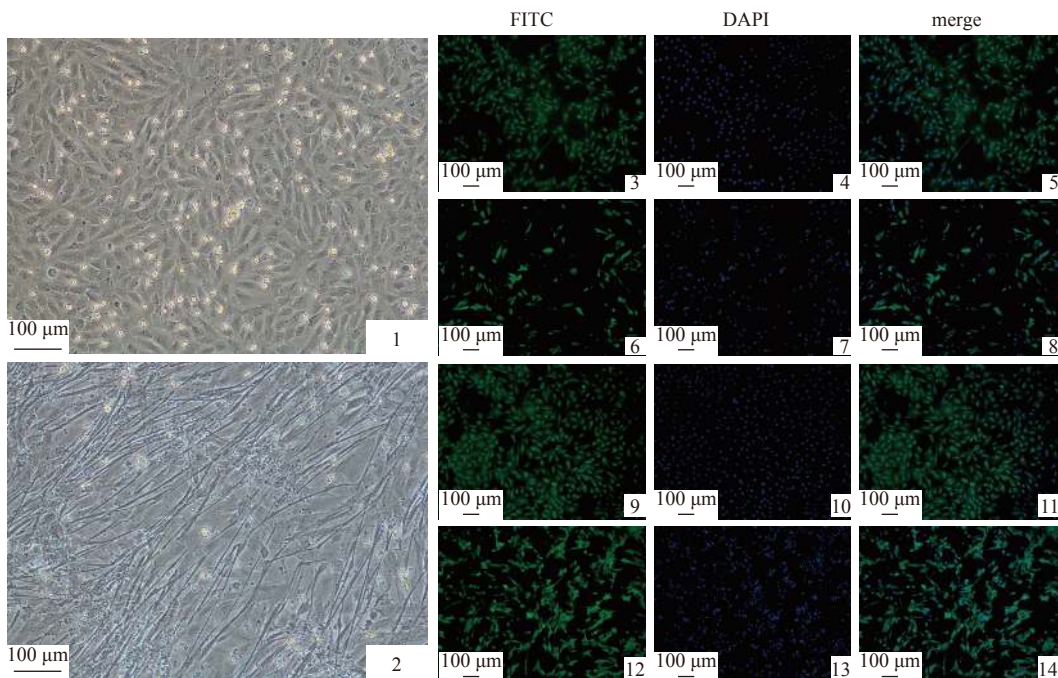


图 8 葡萄糖耐量后 irisin 在各组织中的相对变化

(a) 葡萄糖耐量后 irisinA 在各组织中的相对变化; (b) 葡萄糖耐量后 irisinB 在各组织中的相对变化, 1. 脑, 2. 肠道, 3. 心脏, 4. 肝胰脏。星号表明组间存在显著差异, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 下同。

Fig. 8 Relative changes of irisin in various tissues after OGTT

(a) relative changes of irisinA in various tissues after OGTT; (b) relative changes of irisinB in various tissues after OGTT, 1. brain, 2. intestine, 3. heart, 4. hepatopancreas. Asterisks indicated the significant differences between groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, the same below.



图版III 免疫荧光检测鲤肌细胞分化前后 irisin 相对变化

1. 第 40 代鲤肌细胞 (100×); 2. 2% 马血清诱导第 40 代鲤肌细胞 (100×); 3 和 6 分别为 2% 马血清诱导前后, 第 40 代鲤肌细胞 irisinA 荧光含量相对变化; 9 和 12 分别为 2% 马血清诱导前后, 第 40 代鲤肌细胞 irisinB 荧光含量相对变化。

Plate III Relative changes of irisin in differentiation process of *C. carpio* myocytes

1. P40 *C. carpio* myocytes (100×); 2. P40 *C. carpio* myocytes induced by 2% horse serum (100×); 3 and 6. the relative changes of irisinA fluorescence content in P40 common carp myocytes before and after induction with 2% horse serum; 9 and 12. the relative changes of irisinB fluorescence content in P40 *C. carpio* myocytes before and after induction with 2% horse serum.

这表明 irisin 的功能可能更为保守。在对鲤的研究中, 得到的 irisinA 和 irisinB 的氨基酸同源性较高 (77.68%), 如何生产出特异性蛋白以及避免抗体间出现交叉反应成为本研究的难点。用获得的重组蛋白作为抗原免疫 NIH 阴性鼠, 获得 irisinA 和 irisinB 的多克隆抗血清, 用 ELISA 的方法检测

抗血清效价分别达到 9.0×10^4 和 2.7×10^5 , 效价近似于先前制备的鲤营养素转运载体^[35-36]。哺乳动物中使用同类方法制备的 irisin 多克隆抗体已用于 Western blot 检测细胞中 irisin 蛋白的表达, 免疫组织化学 (IHC)、免疫细胞化学 (ICC) 和免疫荧光法 (IF) 检测 irisin 在组织和细胞中的精确定位以

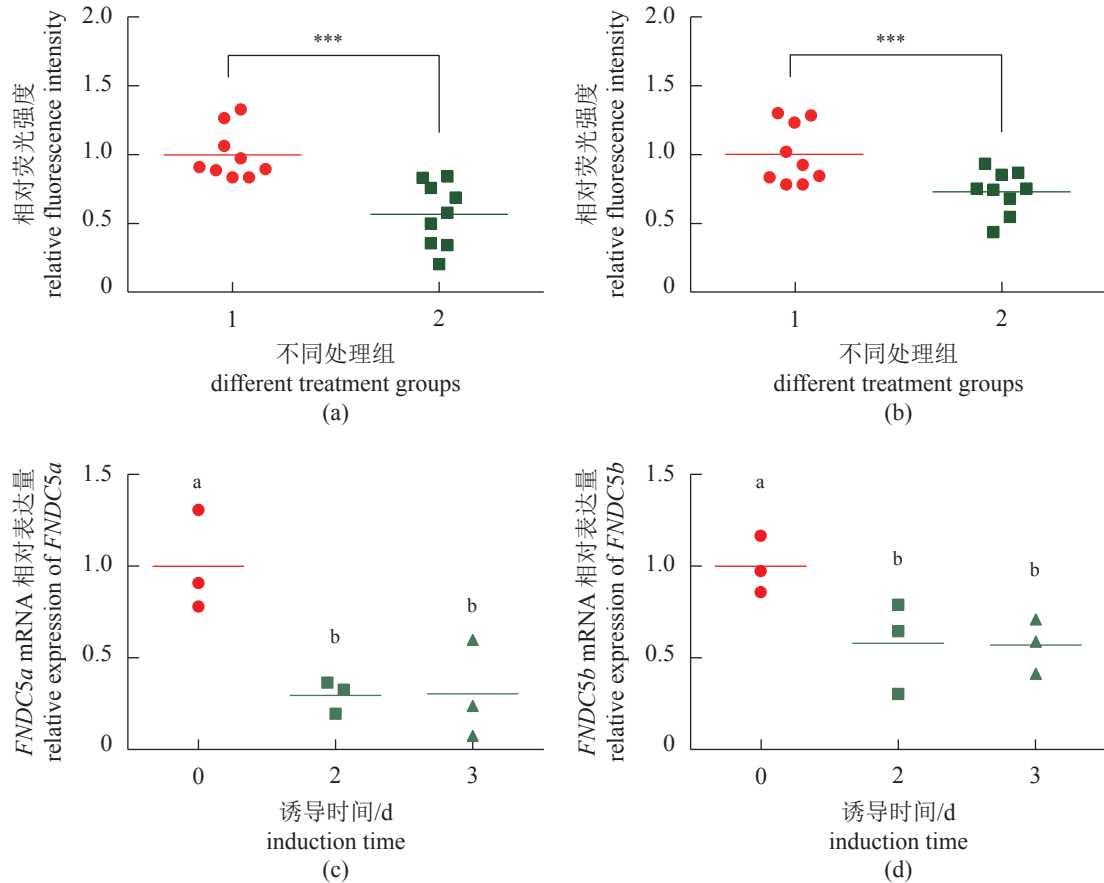


图9 2%马血清诱导前后第40代鲤肌细胞分化前后 *FNDC5* mRNA 和 *irisin* 的表达变化 (a) *irisinA*, (b) *irisinB*; 1. 对照组, 2. 2%马血清诱导组; (c) *FNDC5a* mRNA; (d) *FNDC5b* mRNA。红色圆圈代表未分化组, 绿色正方形为分化2 d组, 绿色三角形为分化3 d组。

Fig. 9 Relative changes of *FNDC5* mRNA and *irisin* in differentiation process of P40 *C. carpio* myocytes before and after induction with 2% horse serum

(a) *irisinA*, (b) *irisinB*; 1. control group, 2. 2% horse serum induction group; (c) *FNDC5a* mRNA, (d) *FNDC5b* mRNA. The red circle represents the undifferentiated group, the green square represents the 2-day differentiation group, and the green triangle represents the 3-day differentiation group.

及血清、组织中 *irisin* 含量的定量检测^[37-39]。抗体交叉验证证明, 鲤 *irisinA* 和 *irisinB* 多克隆抗体具有特异性且不存在交叉反应, 可以用于后续实验。

以本实验制备的多克隆抗体为工具, 检测葡萄糖灌喂后鲤血清 *irisin* 的合成变化。ELISA 检测结果显示, 灌喂后 *irisinA* 和 *irisinB* 的合成量呈现不规则变化, *irisin* 含量与血糖并未呈现显著相关。在基础血浆水平, *irisin* 循环水平与葡萄糖水平呈正相关; 然而, 血清 *irisin* 浓度不受 OGTT 期间血糖或胰岛素增加的影响^[40], 这与本实验结果一致。也有研究表明, 患有多囊卵巢综合征 (PCOS) 的成年女性血清 *irisin* 与葡萄糖水平呈显著正相关^[41], 经二甲双胍处理的 db/db 小鼠血糖与血清 *irisin* 浓度同样呈正相关^[42]。有研究报道, 健康人群、肥胖人群以及二型糖尿病患者的血糖水平与 *irisin* 水

平呈显著负相关^[43-44]。这意味着 *irisin* 与血糖之间的关系受物种以及机体代谢状态的影响。组织分布结果表明, *irisin* 在脑中含量最高, 其次是肝胰脏、心脏、肠道, 与本研究团队之前在转录水平的研究结果一致^[13]。葡萄糖耐量 1 h 后, 脑、肝胰脏、心脏和肠道中的 *irisinA* 和 *irisinB* 含量显著增加, 这可能预示着 *irisin* 在机体糖代谢中扮演着重要作用。已有大量研究表明, *irisin* 作为一种促肌源性因子, 能够促进如脂肪细胞、骨细胞、肌细胞等多种细胞的分化和肌肉再生^[11, 45-46]。在本团队的研究中, 使用 2% 的马血清诱导后, *FNDC5* 的 mRNA 表达以及 *irisin* 含量均显著下调。有研究表明, 对于原代培养的人肌细胞中 *irisin* 的分泌以及 *FNDC5* mRNA 的表达在肌细胞分化过程中上调, 与本实验结果不一致^[11], 产生这一现象的原

因有待进一步研究。

综上所述, 通过本实验制备了具有较高亲和力、特异性和效价的 irisinA 和 irisinB 的多克隆抗体, 并可用于蛋白质水平的检测。该结果初步探究了不同条件下 irisin 蛋白水平的变化, 为明晰 irisin 在机体糖代谢中的作用, 完善鱼类糖代谢的内分泌调控网络, 以及深入开展鱼类糖代谢相关研究奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Ige B A. Probiotics use in intensive fish farming[J]. *African journal of Microbiology research*, 2013, 7(22): 2701-2711.
- [2] 孙昭宁, 孔伟丽, 潘洋, 等. 我国渔业科技发展特点及展望[J]. *农业科技管理*, 2019, 38(3): 5-7,17.
Sun Z N, Kong W L, Pan Y, *et al.* Characteristics and prospect of the development of China's fishery science and technology[J]. *Management of Agricultural Science and Technology*, 2019, 38(3): 5-7,17 (in Chinese).
- [3] Grisdale-Helland B, Helland S J. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage[J]. *Aquaculture*, 1997, 152(1-4): 167-180.
- [4] Stone D A J. Dietary carbohydrate utilization by fish[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2003, 11(4): 337-369.
- [5] Ablett R F, Taylor M J, Selivonchick D P. The effect of high-protein and high-carbohydrate diets on [¹²⁵I] iodoinulin binding in skeletal muscle plasma membranes and isolated hepatocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *British Journal of Nutrition*, 1983, 50(1): 129-139.
- [6] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: new insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. *Aquaculture*, 2017, 467: 3-27.
- [7] Spiegelman B M, Flier J S. Obesity and the regulation of energy balance[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 531-543.
- [8] Perakakis N, Triantafyllou G A, Fernández-Real J M, *et al.* Physiology and role of irisin in glucose homeostasis [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 13(6): 324-337.
- [9] Novelle M G, Contreras C, Romero-Picó A, *et al.* Irisin, two years later[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 2013: 746281.
- [10] Lee P, Linderman J D, Smith S, *et al.* Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(2): 302-309.
- [11] Huh J Y, Dincer F, Mesfum E, *et al.* Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans[J]. *International Journal of Obesity*, 2014, 38(12): 1538-1544.
- [12] Huh J Y, Mougios V, Kabasakalis A, *et al.* Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 99(11): E2154-E2161.
- [13] Yang L P, Zhi S Y, Yang G K, *et al.* Molecular identification of FNDC5 and effect of irisin on the glucose metabolism in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 301: 113647.
- [14] Zhi S Y, Yang L P, Yang G K, *et al.* Irisin regulates hepatic glucose metabolism via AMPK and PI3K/Akt activation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 2022: 1946960.
- [15] Zhang X, Hu C, Kong C Y, *et al.* FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2020, 27(2): 540-555.
- [16] Gür F M, Timurkaan S, Gençer Tarakçı B, *et al.* Identification of immunohistochemical localization of irisin in the dwarf hamster (*Phodopus roborovskii*) tissues [J]. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2018, 47(2): 174-179.
- [17] Elbelt U, Hofmann T, Stengel A. Irisin: what promise does it hold? [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2013, 16(5): 541-547.
- [18] Hofmann T, Elbelt U, Stengel A. Irisin as a muscle-derived hormone stimulating thermogenesis – A critical update [J]. *Peptides*, 2014, 54: 89-100.
- [19] Polyzos S A, Mathew H, Mantzoros C S. Irisin: a true, circulating hormone [J]. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 2015, 64(12): 1611-1618.
- [20] Raschke S, Elsen M, Gassenhuber H, *et al.* Evidence against a beneficial effect of irisin in humans [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73680.
- [21] Sanchis-Gomar F, Alis R, Lippi G. Circulating irisin detection: does it really work? [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015, 26(7): 335-336.

- [22] Albrecht E, Norheim F, Thiede B, *et al.* Irisin – a myth rather than an exercise-inducible myokine[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8889.
- [23] Jedrychowski M P, Wrann C D, Paulo J A, *et al.* Detection and quantitation of circulating human irisin by tandem mass spectrometry[J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(4): 734-740.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Xin C, Liu J, Zhang J, *et al.* Irisin improves fatty acid oxidation and glucose utilization in type 2 diabetes by regulating the AMPK signaling pathway[J]. *International Journal of Obesity*, 2015, 40(3): 443-451.
- [26] So W Y, Leung P S. Irisin ameliorates hepatic glucose/lipid metabolism and enhances cell survival in insulin-resistant human HepG2 cells through adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 78: 237-247.
- [27] Zhang Y, Li S, Meng Y, *et al.* Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling[J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 514-525.
- [28] Zhu D, Wang H C, Zhang J L, *et al.* Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015, 87: 138-147.
- [29] Bosma M, Gerling M, Pasto J, *et al.* FNDC4 acts as an anti-inflammatory factor on macrophages and improves colitis in mice[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11314.
- [30] Zhang Y Z, Mu Q, Zhou Z, *et al.* Protective effect of irisin on atherosclerosis via suppressing oxidized low density lipoprotein induced vascular inflammation and endothelial dysfunction[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158038.
- [31] Ferrer-Martinez A, Ruiz-Lozano P, Chien K R. Mouse PeP: a novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development[J]. *Developmental Dynamics*, 2002, 224(2): 154-167.
- [32] Boström P, Wu J, Jedrychowski M P, *et al.* A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468.
- [33] Pekkala S, Wiklund P K, Hulmi J J, *et al.* Are skeletal muscle *FNDC5* gene expression and irisin release regulated by exercise and related to health?[J]. *The Journal of Physiology*, 2013, 591(21): 5393-5400.
- [34] Huh J Y, Siopi A, Mougios V, *et al.* Irisin in response to exercise in humans with and without metabolic syndrome[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 100(3): E453-E457.
- [35] 闫潇, 杨丽萍, 郑文佳, 等. 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[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 513-521.
- Yan X, Yang L P, Zheng W J, *et al.* Preparation of the antibody and tissue distribution of the peptide transporter PepT1 in *Cyprinus carpio* L.[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 513-521 (in Chinese).
- [36] 聂国兴, 王贝, 闫潇, 等. 鲤肠道 $sglt1$ 基因的表达与抗体制备[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 329-335.
- Nie G X, Wang B, Yan X, *et al.* Expression of $sglt1$ gene in *Cyprinus carpio* and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Journal of fisheries of China*, 2012, 36(3): 329-335 (in Chinese).
- [37] Kirat D, Miyasho T, Amin T, *et al.* FNDC5 gene expression in the smooth muscles of dromedary camels (*Camelus dromedarius*)[J]. *International Journal of Veterinary Science*, 2020, 9(1): 121-125.
- [38] Kirat D, Hamada M, Moustafa A, *et al.* Irisin/FNDC5: a participant in camel metabolism[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(1): 693-706.
- [39] Bi J B, Zhang J, Ren Y F, *et al.* Irisin reverses intestinal epithelial barrier dysfunction during intestinal injury via binding to the integrin $\alpha V\beta 5$ receptor[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(1): 996-1009.
- [40] Huerta A E, Prieto-Hontoria P L, Fernández-Galilea M, *et al.* Circulating irisin and glucose metabolism in overweight/obese women: effects of α -lipoic acid and eicosapentaenoic acid[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2015, 71(3): 547-558.
- [41] Sharan B, Sagili H, Kamalanathan S K, *et al.* Serum irisin levels and its association with blood glucose and insulin indices in diagnosing insulin resistance in adolescents with polycystic ovarian syndrome[J]. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2021, 14(2): 137-143.
- [42] Li D J, Huang F, Lu W J, *et al.* Metformin promotes irisin release from murine skeletal muscle independently of AMP-activated protein kinase activation[J]. *Acta physiologica*, 2015, 213(3): 711-721.
- [43] Mostafa T M, El-Gharbawy N M, Werida R H. Circulat-

- ing IRAPe, irisin, and IL-34 in relation to insulin resistance in patients with type 2 diabetes[J]. *Clinical Therapeutics*, 2021, 43(7): E230-E240.
- [44] Rashid F A, Abbas H J, Naser N A, *et al.* Effect of long-term moderate physical exercise on irisin between normal weight and obese men[J]. *The Scientific World Journal*, 2020, 2020: 1897027.
- [45] Yang J J, Wang K Z, An Y A, *et al.* Mst1/2 is necessary for satellite cell differentiation to promote muscle regeneration[J]. *Stem Cells*, 2022, 40(1): 74-87.
- [46] Posa F, Colaianni G, Di Cosola M, *et al.* The myokine irisin promotes osteogenic differentiation of dental bud-derived MSCs[J]. *Biology*, 2021, 10(4): 295.

Preparation and application of polyclonal antibody of irisin of *Cyprinus carpio*

ZHI Shaoyang, YANG Liping, QIN Chaobin, YAN Xiao, ZHANG Wenlei,
LIU Mingyu, ZHAO Mengjuan, NIE Guoxing*

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

Abstract: To further study the relationship between fish glucose metabolism and irisin, the irisin antibody and its application reliability need to be prepared and tested urgently. The Rosetta-irisin expression vector was constructed, and the mice were immunized after protein purification, dialysis, and ultrafiltration. The corresponding polyclonal antibodies were obtained and their specificity and antibody titers were detected. The common carp irisin detection method was established to detect the changes of irisinA and irisinB in carp serum after glucose tolerance and RNAi experiments. The immunofluorescence method was used to detect the expression of irisin in carp brain, heart, hepatopancreas, and intestine, and the changes of irisin content in these tissues after glucose tolerance. Detection of the irisin content after carp myocytes differentiation was conducted. Compared with the BL21-irisin expression vector, the expression of carp irisinA/B protein by the Rosetta-irisin expression vector increased by 2.3/1.6 times at 4 h of IPTG induction; irisinA and irisinB antibody titers were 9.0×10^4 and 2.7×10^5 , respectively. And there was no cross-reaction between irisinA and irisinB polyclonal antibodies, the irisinA and irisinB can be measured respectively. IrisinA and irisinB contents showed different changes after OGTT. After RNAi, irisin was significantly decreased. Immunofluorescence results showed that irisin was the most abundant in the brain, followed by hepatopancreas, and relatively less in the heart and intestine. After OGTT, the fluorescence intensity of irisinA and irisinB in the brain, liver, heart, and gut increased significantly. The results of qPCR and immunofluorescence showed that the *FNDC5* mRNA expression and irisin decreased significantly after carp myocyte differentiation. In this experiment, high affinity and specific irisinA and irisinB antibodies were prepared, and their application reliability was tested. The acquisition of this antibody laid the foundation for the systematic study of carp glucose metabolism. At the same time, the irisin detection methods could be widely used in the quantitative study of irisin protein levels in other fish.

Key words: *Cyprinus carpio*; irisinA; irisinB; polyclonal antibody; glucose metabolism; myocytes

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872581, 31902384, 31902386); Zhongyuan Thousand Talents Plan Leading Talents of Zhongyuan Science and Technology of Henan Province (204200510025); Innovation Scientists and Technicians Troop Construction Projects of Henan Normal University (2020TD02); Special Fund for Henan Agriculture Research System (HARS-22-16-G2)