

文章编号: 1000-0615(2018)10-1615-11

DOI: 10.11964/jfc.20171010998

鲤细胞因子多克隆抗体的制备及检测

冯军厂, 常绪路, 朱振祥, 郭祥瑞, 赵燕静,
刘慧芬, 张建新, 聂国兴*

(河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心,
水产动物疾病控制河南省工程实验室, 河南新乡 453007)

摘要: 为从蛋白质水平研究细胞因子在鲤体内免疫应答过程中的合成变化, 本研究采用PCR技术克隆*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*、*IL-10*和*TGF- β* 基因含有部分抗原决定簇的片段, 引入双酶切位点*BamH I*和*Hind III*后连接至pET-32a/21a, 构建相应的表达载体, 制备多克隆抗体。采用ELISA检测抗体效价, 并以此作为实验工具, 检测经嗜水气单胞菌感染后鲤血清中炎性细胞因子的合成变化。结果显示, 基因*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*、*IL-10*和*TGF- β* 融合蛋白分子量分别约为31.8、31.7、35.3、32.5、18.0和33.6 ku; 抗体效价达到 2.4×10^6 ; 在病原菌感染后的不同阶段, 促炎细胞因子*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*和抗炎细胞因子*IL-10*、*TGF- β* 呈现出不同的合成变化。研究表明, 制备的抗体具有较高的效价、亲和力和特异性, 可用于鲤细胞因子的定量研究, 该抗体的获得为鲤免疫应答与细胞因子合成的系统研究奠定了基础。同时, 获取的鲤细胞因子*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*、*IL-10*和*TGF- β* 的抗体亦可用于其他鱼类细胞因子蛋白质水平的定量研究。

关键词: 鲤; 细胞因子; 原核表达; 抗体效价; 病原菌; ELISA

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

水产养殖业增速快、贡献大, 已成为全球增长最快的食品生产行业^[1-2]。然而病害一直是水产养殖业快速增长的一个障碍^[3], 限制了水产养殖业的快速发展, 并增加了水产动物的死亡率^[4-5]。细菌性疾病作为病害因素之一, 对养殖业造成巨大经济损失。作为免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导多种细胞产生的低分子量可溶性蛋白质, 细胞因子具有调节固有免疫和适应性免疫^[6]、细胞分化和生长^[7]以及损伤组织修复^[8]等多种功能。研究表明, 宿主经病原菌感染后会引发细菌性疾病, 其体内细胞因子的合成、调控等出现异常均会引起机体的免疫应答, 导致机体出现相应的病理变化, 最终增加养殖动物的死亡率, 因此细胞因子在宿主免疫应答过程中合成变化的检测具有重要意义。如在家禽

的研究中, 经病原菌感染后的第1、第3和第5天, 无论是促炎细胞因子*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*, 还是抗炎细胞因子*IL-10*, 在血清中蛋白质水平的合成量均显著高于对照组^[9]; 相似的结果显示, 致病菌同样能够显著增加肉鸡(*Gallus gallus*)肠道促炎细胞因子*IL-1 β* 、*IL-6*和抗炎细胞因子*IL-10*在转录水平的表达量^[10]。在哺乳动物的研究中, 经病原菌感染后的第3和第6天, 小鼠(*Mus musculus*)血清中促炎细胞因子*TNF- α* 和*IL-6*在蛋白质水平的合成量均显著高于对照组, 但抗炎细胞因子*IL-10*无显著性差异^[11]。

然而, 由于缺乏相应的ELISA检测试剂盒或抗体, 水产养殖动物中关于炎性细胞因子在蛋白质水平的检测还相对较少, 大部分局限于转录水平的检测。如在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)

收稿日期: 2017-10-13 修回日期: 2017-12-25

资助项目: 河南省创新型科技团队支持计划(CXTD2016043); 河南师范大学博士启动基金(qd16155); 河南省重点科技攻关项目(172102110195, 172102210343); 河南省高等学校重点科研项目(17B240002, 16A240004); 河南师范大学校青年基金(2016QK23)

通信作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

中, 体外感染病原菌 *Edwardsiella tarda* 后, 头肾细胞在转录组水平能大量表达 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-6*^[12]。此外, 当用嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*), 其肝脏中促炎细胞因子 *IL-4*、*IL-12* 和 *IFN- γ* 在转录组水平的表达量均显著高于感染前的表达水平^[13]。这种局限制约了水产养殖动物关于免疫应答更深入的研究。

因此, 本研究拟通过原核表达技术获得包含抗原决定簇的鲤 (*Cyprinus carpio*) 炎性细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*、*IL-10* 和 *TGF- β* 的目的蛋白, 对其进行纯化后免疫新西兰大耳兔 (*Oryctolagus cuniculus*), 获得相应的多克隆抗体, 以此作为工具, 检测经嗜水气单胞菌感染后鲤血清中炎性细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*、*IL-10* 和 *TGF- β* 在蛋白质水平的合成情况, 为更深入研究水产养殖动物免疫应答提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象 健康鲤75尾, 体长(16.5 \pm 1.0) cm,

体质量(55.0 \pm 1.5) g, 养殖于河南师范大学水产养殖基地。

1.2 重组表达质粒的构建

鲤肠道组织总RNA的提取及cDNA第一链的合成 随机挑取3尾健康鲤, 在无菌条件下取出肠道, 并用预冷无菌的PBS快速清除内容物以及剥离肠系膜组织, 剪碎后于液氮中保存备用。按照E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II RNA提取试剂盒(OMEGA)说明书提取鲤肠道组织总RNA, 并通过Nanodrop 2000和琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品的质量。按照cDNA逆转录试剂盒(Fermentas)说明书获得第一链cDNA。

重组表达质粒的构建及鉴定 根据目的基因开放阅读框翻译成蛋白序列, 利用DNASTAR软件中的Protean分析及预测鲤细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-12*、*IL-10* 和 *TGF- β* 氨基酸序列的抗原决定簇区域, 用Primer 5.0设计相应的特异性引物, 并含有特定的酶切位点(表1)。对目的基因进行PCR扩增(扩增条件: 95 °C 3 min; 30个循环包括95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min和12 °C保存), 按照DNA胶回收试剂盒(上

表1 原核表达过程中所用基因的引物序列及相关信息

Tab. 1 The gene primer sequences used in the process of prokaryotic expression and the relevant information

基因 gene	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 component cells	融合蛋白大小/ku fusion protein size	基因序列号 GenBank no.
<i>TNF-α</i>	CGGGATCC AACAAGTCTCAGAACAATCAG	<i>Bam</i> H I	226	pET32a	BL21 (DE3) ^a	31.8	AJ311800.2
	CCAAGCTT TGCCGTCAGTAGGAATG	<i>Hind</i> III					
<i>IL-1β</i>	CGGGATCC TGTACCCAGTTAGATGGTTCT	<i>Bam</i> H I	217	pET32a	BL21 (DE3)	31.7	AB010701.1
	CCAAGCTT TTGGCATCTGGTTCATTT	<i>Hind</i> III					
<i>IL-6</i>	CGGGATCC ACAGTGATGGAGCAGCA	<i>Bam</i> H I	316	pET32a	BL21 (DE3)	35.3	AY102632.1
	CCAAGCTT AAGAACCATTTTGGTACTT	<i>Hind</i> III					
<i>IL-12</i>	CGGGATCC ATCAAGAATACTCTGAGAAAG	<i>Bam</i> H I	238	pET21a	BL21 (DE3)	32.5	AJ621425.1
	CCAAGCTT TCAGGTTGATGCGCTC	<i>Hind</i> III					
<i>IL-10</i>	CGGGATCC GAGGGCTTCCAGTGAG	<i>Bam</i> H I	387	pET32a	BL21 (DE3)	18.0	AB110780.1
	CCAAGCTT GAGGATATCAAGCTCTCCC	<i>Hind</i> III					
<i>TGF-β</i>	CGGGATCC AACCCGATAATCTCCAG	<i>Bam</i> H I	253	pET32a	BL21 (DE3)	33.6	AF136947.1
	CCAAGCTT GAAATGTCTTCTGAGGATCA	<i>Hind</i> III					

注: 下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 的酶切位点。a. BL21(DE3) 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 *Bam*H I and *Hind* III, respectively. a. The BL21 (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

海生工)回收目的片段。将回收的目的片段和表达载体pET32a/21a同时进行双酶切(酶切体系:底物52 μL 、*Bam*H I 1 μL 、*Hind* III 1 μL 、10 \times Buffer 6 μL ;酶切条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜)后,对酶切片段胶回收,按照T₄ DNA连接酶的说明书设计连接反应体系,构建重组表达质粒,并转化DH5 α ,筛选阳性克隆,按照质粒抽提试剂盒(上海生工)说明书提取质粒,并对质粒进行单双酶切和测序验证。

1.3 融合蛋白的原核表达及纯化

融合蛋白的原核表达 将阳性重组表达质粒pET32a-TNF- α 、pET32a-IL-1 β 、pET32a-IL-6、pET21a-IL-10、pET32a-IL-12、pET32a-TGF- β 转化表达感受态BL21(DE3),筛选阳性表达菌株,接种于2 mL液体LB培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇动培养6 h,随后将培养的菌液加入200 mL液体LB培养基中扩大培养至菌液OD₆₀₀达到0.5~0.6时,加入IPTG(终浓度1 mmol/L)诱导剂,37 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min,振荡诱导培养8~10 h。采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)的方法对原核表达的融合蛋白进行检测,以未经IPTG诱导的菌体样品为对照。

融合蛋白的纯化 经SDS-PAGE检测融合蛋白条带后,室温离心(8 000 $\times g$, 5 min)收集菌体,加入适量的变性结合缓冲液(20 mmol/L Na₃PO₄、15 mmol/L C₃H₄N₂、500 mmol/L NaCl、6 mol/L CH₄N₂O, pH 7.4),采用超声波破碎(破3 s,停3 s;功率50%;破碎时间60 min)的方法获得融合蛋白的包涵体。借助变性洗脱缓冲液(20 mmol/L Na₃PO₄、500 mmol/L C₃H₄N₂、500 mmol/L NaCl、6 mol/L CH₄N₂O, pH 7.4),通过His Trap HP柱对融合蛋白进行纯化,并用透析方法尽量去除融合蛋白溶液中的CH₄N₂O和C₃H₄N₂等盐离子。

1.4 多克隆抗体的制备

免疫动物 经Nanodrop 2000检测纯化的蛋白质浓度,用生理盐水(0.65% NaCl溶液)将蛋白质浓度调整为300 $\mu\text{g}/\text{mL}$,1 mL/管分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存备用。将分装的蛋白质溶液与弗氏佐剂(1:1)(Sigma)通过涡旋的方法充分混匀,达到“油包水”的乳化状态,采用耳缘静脉和皮下(腹部及背部,4~6个点)多点注射的方法免疫新西兰大耳兔^[14-15]。每隔1周加强免疫1次,共免疫5次

(注:初次免疫使用弗氏完全佐剂,后续的加强免疫使用弗氏不完全佐剂;耳缘静脉注射要避免气泡的混入)。

抗体效价的检测及血清的收集 采用ELISA方法检测。用纯化的融合蛋白溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被稀释液)包被酶标板,以纯包被液(0.05 mol/L碳酸盐缓冲液, pH 9.6)作空白对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h(10%脱脂奶粉)后加不同稀释度的抗血清(1:10²、1:10³、1:10⁴、1:3 \times 10⁴、1:9 \times 10⁴、1:2.7 \times 10⁵、1:8.1 \times 10⁵、1:2.4 \times 10⁶)及阴性对照血清(未免疫兔血清),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, PBST洗涤3次;HRP标记的羊抗兔二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBST洗涤3次;TMB显色30 min,硫酸溶液终止反应后测定A_{450 nm}值。抗体效价判定标准:处理组/阴性对照的光吸收比值 ≥ 2 ,抗血清的最大稀释倍数为待测抗血清的效价。血清效价检测达标后,通过心脏取血,以获得免疫血清,分装后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 攻毒实验

选取72尾体质量为(55.0 \pm 1.5) g的鲤,随机分为2组,每组设3个平行,每个平行放养12尾鲤。其中A组为阴性对照组,即正常组;B组为阳性对照组,即攻毒组。饲养实验在河南师范大学水产养殖基地循环养殖系统中完成。饲养过程中,定时监测水质,水温(26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, pH 6.5~7.5,氨氮 < 0.01 mg/L,水交换量5 L/min, DO > 5 mg/L。每天饲喂4次,分别于8:30、11:30、14:30和17:30投喂,投饲率为3%。驯化1周后,对B组的每尾鲤腹腔注射浓度为5 $\times 10^6$ cfu/mL的嗜水气单胞菌100 μL ,A组腹腔注射100 μL PBS(0.8% NaCl、0.02% KCl、0.027% KH₂PO₄、0.358% Na₂HPO₄·12H₂O, pH 7.4)。在注射后的第1和第3天通过尾静脉取血,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜后离心收集血清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于相应指标的测定。

1.6 鲤血清中细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12及IL-10、TGF- β 含量的检测

采用ELISA方法检测血清中促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12和抗炎细胞因子IL-10、TGF- β 的合成量。具体操作步骤:将收集的血清用2 \times 包被液等比稀释后,加入酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。一抗孵育时,将血清按1:10 000稀释混匀后加入酶标板,其他处理完全同“多克隆抗体的制备”。

1.7 数据分析

实验中所有的数据均采用平均值±标准差的形式呈现(n=6)。显著性分析采用SPSS 17.0的One-Way ANOVA中Scheffe指标,显著性水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 鲤细胞因子基因抗原决定簇片段的克隆

根据鲤TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 全长cDNA片段为模板,以表1中的引物进行PCR扩增,分别在250、200、300、250、400和250 bp附近获得一条特异性的条带(图1),实际大小分别为226、217、316、238、387和253 bp,大小与预期一致。

2.2 重组表达质粒的酶切及测序验证

对筛选获得的阳性重组表达质粒pET-32a-TNF- α (226 bp)、pET-32a-IL-1 β (217 bp)、pET-32a-IL-6 (316 bp)、pET-32a-IL-12 (238 bp)、pET-

21a-IL-10 (387 bp)和pET-32a-TGF- β (253 bp)进行单酶切(*Hind* III)及双酶切(*Bam*H I和*Hind* III)处理,检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 目的片段是否连接到表达载体pET-32a/21a上。酶切结束后,经1.0%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果,pET-32a-TNF- α (226 bp)、pET-32a-IL-1 β (217 bp)、pET-32a-IL-6 (316 bp)、pET-32a-IL-12 (238 bp)、pET-21a-IL-10 (387 bp)和pET-32a-TGF- β (253 bp)均为阳性重组表达质粒(图2)。

此外,将单、双酶切验证的重组表达质粒经测序检测后,与NCBI数据库中已提交的基因序列比对,同源性均在99%以上,说明实验操作中所插入的片段均为目的片段。

2.3 融合蛋白的表达及纯化

重组表达质粒pET-32a-TNF- α (226 bp)、pET-32a-IL-1 β (217 bp)、pET-32a-IL-6 (316 bp)、pET-32a-IL-12 (238 bp)、pET-21a-IL-10 (387 bp)和pET-32a-TGF- β (253 bp)在大肠杆菌BL21 (DE3)中经IPTG诱导合成,并选用含有重组表达质粒但无

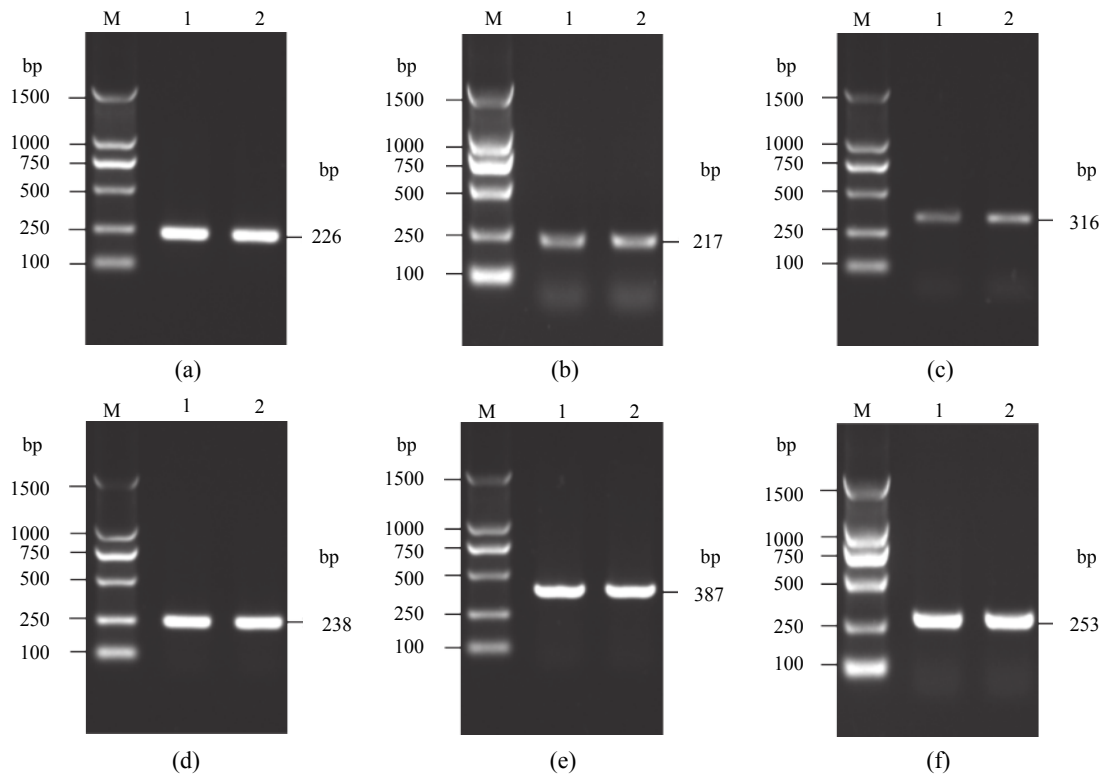


图1 鲤细胞因子抗原决定簇区域PCR克隆产物的电泳分析

M. D2000 bp DNA ladder; 1, 2. PCR产物

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of PCR product of cytokines

M. D2000 bp DNA ladder; 1, 2. the product of PCR; (a) TNF- α , (b) IL-1 β , (c) IL-6, (d) IL-12, (e) IL-10, (f) TGF- β , the same below

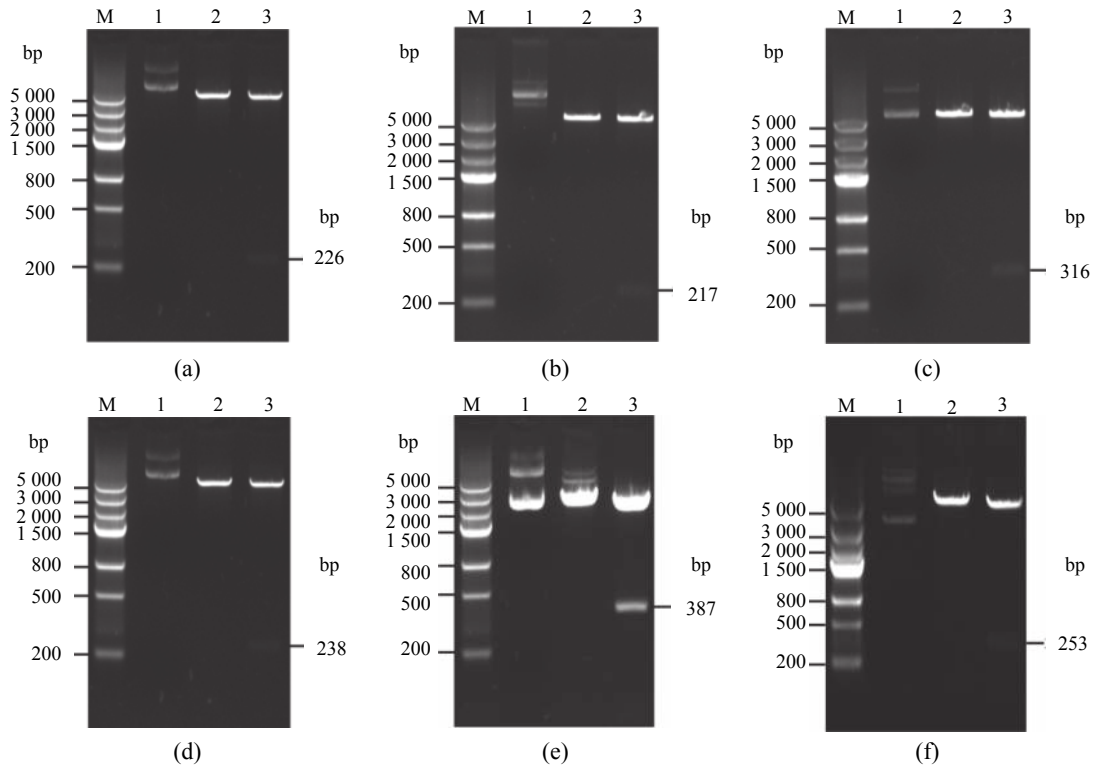


图 2 重组表达质粒的单双酶切验证

M. D2000 plus DNA ladder; 1. 重组质粒; 2. 重组质粒单酶切; 3. 重组质粒双酶切

Fig. 2 The single and double enzyme digestion of recombinant expression plasmid

M. D2000 plus DNA ladder; 1. recombinant plasmid; 2. single digestion of recombinant plasmid; 3. double digestion of recombinant plasmid

IPTG诱导的菌液作阴性对照。蛋白电泳结果各显示一条特异性合成条带, 大小分别约30.0或18.0 ku(图3)(实际大小分别为31.8、31.7、35.3、32.5、18.0和33.6 ku), 而阴性对照组在此位置没有特异性条带。

离心收集合成目的蛋白的菌液, 超声破碎后经His柱纯化, 并通过透析的方法去除溶液中的咪唑和尿素等离子。以含有重组表达质粒但无IPTG诱导的菌液作阴性对照, 经IPTG诱导合成的菌液作阳性对照, 最终纯化的融合蛋白溶液经SDS-PAGE检测。结果显示, 与阳性对照组相比, 纯化后的融合蛋白溶液中杂蛋白的含量显著减少(图3)。

2.4 抗血清效价的检测

采用ELISA方法检测收集的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6个鲤细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12、IL-10和TGF-β多克隆抗体的效价在血清稀释至2.4×10⁶时, 该比值仍大于2(表2~表7), 因

此, 判定制备的多克隆抗体的效价均为2.4×10⁶, 可用于后续实验中指标的检测。

2.5 血清中细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12及IL-10、TGF-β的含量测定

鲤用PBS或嗜水气单胞菌腹腔注射后的第1和第3天, 检测血液中促炎细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12和抗炎细胞因子IL-10、TGF-β的合成水平。与阴性对照组相比, 在感染嗜水气单胞菌后的第1天, 细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12和IL-10、TGF-β的合成量均显著增加并达到最大值(P<0.05)(图4), 特别是促炎细胞因子TNF-α、IL-1β和IL-12, 其合成量较阴性对照组分别增加了3.97倍、6.48倍和4.77倍(图4-a, b, d)。但是, 随着持续感染, 促炎细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12的合成量逐渐降低, 并与阴性对照组无显著性差异(P>0.05)(图4-a, b, c, d)。与促炎细胞因子合成情况不同的是, 在感染嗜水气单胞菌后的第3天, 抗炎细胞因子IL-10和TGF-β的合成量仍显著高于阴性对照组(P<0.05)(图4-e, f)。总体

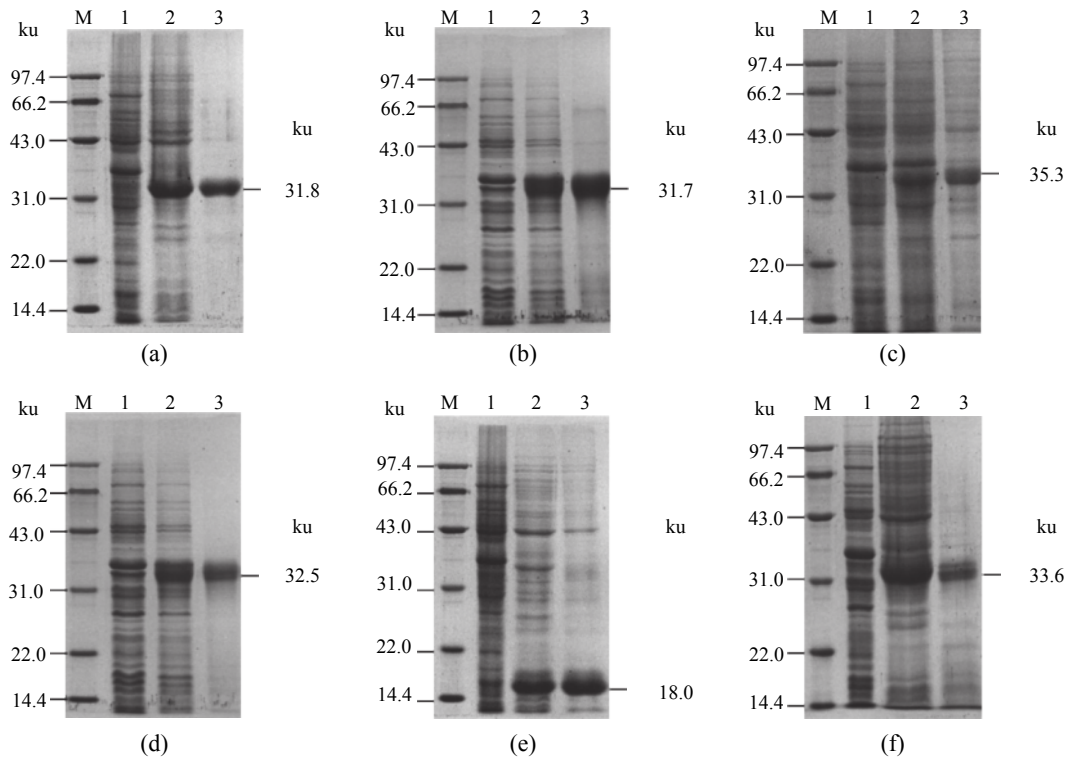


图3 融合蛋白的原核表达及纯化

M. 低分子量蛋白marker; 1. 未经IPTG诱导的合成组; 2. 经IPTG诱导的合成组; 3. 融合蛋白纯化组

Fig. 3 Prokaryotic expression and purification of fusion proteins

M. protein molecular weight marker (low); 1. without IPTG inducement group; 2. induced by IPTG group; 3. purified fusion protein group

表2 ELISA方法测定多克隆抗体TNF-α效价

Tab. 2 The detection of TNF-α polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	1.308	1.186	1.103	0.971	0.898	0.527	0.230	0.141
阴性对照组 negative control	0.209	0.077	0.068	0.066	0.064	0.062	0.061	0.061
空白对照组 blank control	0.060	0.059	0.061	0.058	0.060	0.058	0.059	0.060
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	6.258	15.403	16.221	14.712	14.031	8.500	3.770	2.311

表3 ELISA方法测定多克隆抗体IL-1β效价

Tab. 3 The detection of IL-1β polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	1.447	1.053	0.920	0.969	0.798	0.497	0.344	0.152
阴性对照组 negative control	0.438	0.109	0.070	0.068	0.064	0.062	0.063	0.061
空白对照组 blank control	0.060	0.059	0.061	0.058	0.060	0.058	0.059	0.060
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	3.304	9.661	13.143	14.250	12.469	8.016	5.460	2.492

表 4 ELISA方法测定多克隆抗体IL-6效价

Tab. 4 The detection of IL-6 polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	1.137	0.988	0.596	0.596	0.577	0.562	0.292	0.220
阴性对照组 negative control	0.332	0.196	0.079	0.066	0.066	0.065	0.063	0.062
空白对照组 blank control	0.060	0.059	0.061	0.058	0.060	0.058	0.059	0.060
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	3.425	5.041	7.541	9.030	8.742	8.646	4.635	3.548

表 5 ELISA方法测定多克隆抗体IL-12效价

Tab. 5 The detection of IL-12 polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	1.254	0.742	0.626	0.619	0.631	0.290	0.185	0.144
阴性对照组 negative control	0.303	0.098	0.067	0.066	0.063	0.062	0.060	0.061
空白对照组 blank control	0.060	0.059	0.061	0.058	0.060	0.058	0.059	0.060
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	4.139	7.571	9.343	9.379	10.016	4.678	3.083	2.361

表 6 ELISA方法测定多克隆抗体IL-10效价

Tab. 6 The detection of IL-10 polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	0.992	0.853	0.675	0.650	0.626	0.412	0.161	0.131
阴性对照组 negative control	0.282	0.151	0.080	0.076	0.069	0.069	0.064	0.061
空白对照组 blank control	0.060	0.059	0.061	0.058	0.060	0.058	0.059	0.060
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	3.518	5.649	8.438	8.553	9.072	5.971	2.516	2.148

表 7 ELISA方法测定多克隆抗体TGF- β 效价Tab. 7 The detection of TGF- β polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	稀释梯度 dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 dilution ratio	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^5	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment	1.408	0.921	0.820	0.825	0.726	0.359	0.214	0.144
阴性对照组 negative control	0.321	0.240	0.085	0.078	0.069	0.065	0.064	0.061
空白对照组 blank control	0.060	0.059	0.061	0.058	0.060	0.058	0.059	0.060
处理组/阴性对照组 treatment/negative control	4.386	3.838	9.647	10.577	10.522	5.523	3.344	2.361

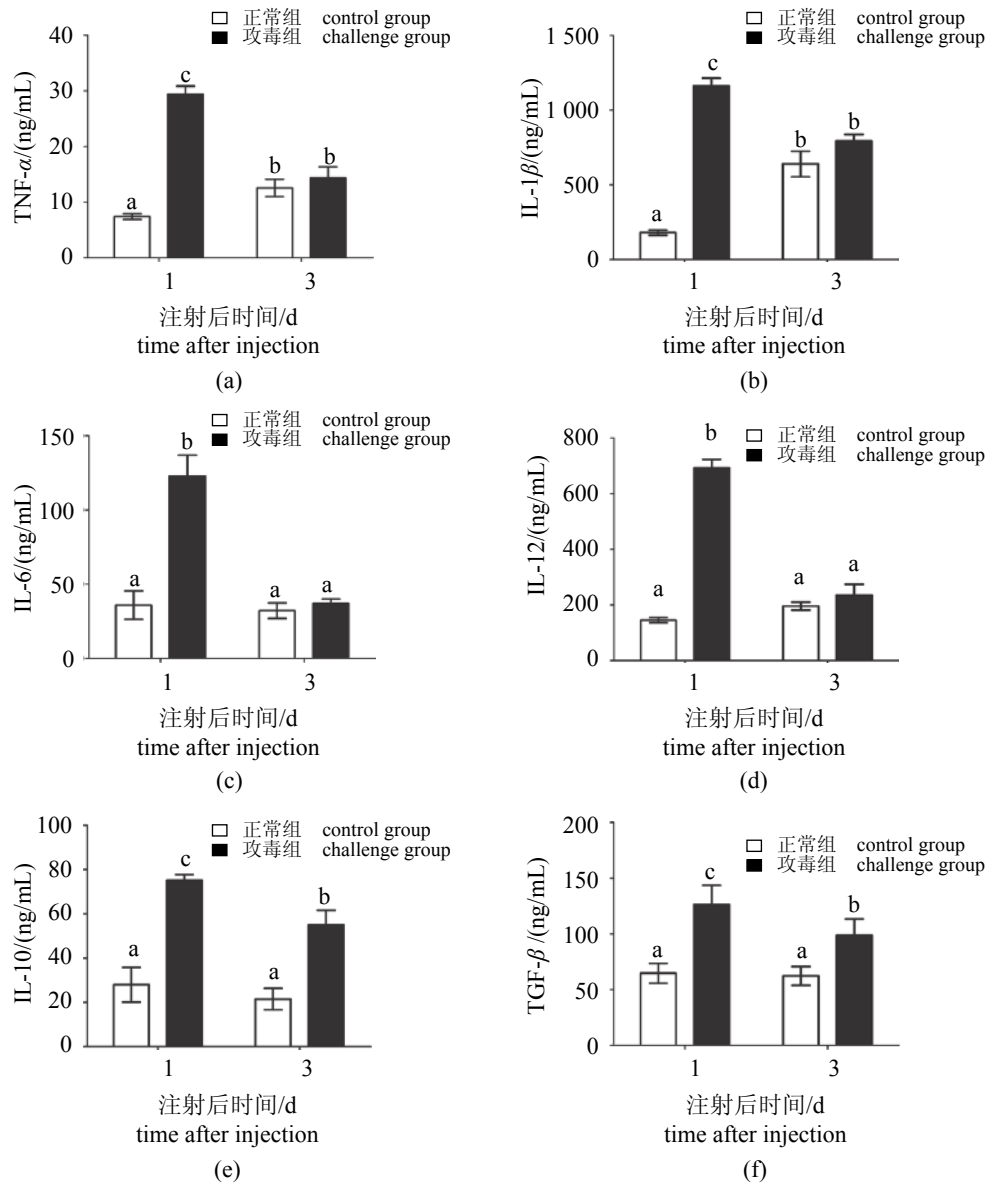


图4 血清中细胞因子水平的检测

图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 4 The detection of cytokines level in serum

Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$)

而言, 实验室制备的鲤细胞因子多克隆抗体可用于鲤细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 蛋白质水平定量的检测。

3 讨论

对于促炎细胞因子来说, TNF- α 是机体抵抗病原菌入侵并涉及全身系统性炎症的促炎性细胞因子, 参与机体炎症的急性反应。该细胞因子主要由巨噬细胞、上皮细胞、淋巴细胞等分

泌^[16]。IL-1 β 主要由单核细胞、巨噬细胞、肠细胞和其他细胞分泌产生^[17], 研究表明, IL-1 β 所代表的是一个早期的炎症反应过程^[18]。IL-6由T细胞和巨噬细胞分泌而刺激免疫应答, 在抵抗病原菌侵染的过程中也发挥重要作用^[19]。IL-12能够刺激T细胞的生长和功能的发挥, 它还能够刺激NK细胞和T细胞分泌IFN- γ ^[20]。而作为抗炎细胞因子, IL-10和TGF- β 的主要功能是抑制炎症的发生, 由活化的巨噬细胞和T细胞产生^[21], 该

细胞因子能够抑制T细胞的增殖, 并且还能够抑制许多促炎细胞因子的释放^[22]。

本研究利用DNASTAR软件中的Protean分析及预测鲤细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 氨基酸序列的抗原决定簇区域。由于氨基酸序列的抗原决定簇呈现间断性分布, 而且在以往的实验摸索中已经证实合成全长蛋白的成功率极低, 因此, 本研究只选取基因开放阅读框的部分区域用于蛋白质的合成^[15, 23-24]。此外, 经软件DNAMAN分析所选抗原决定簇的同源性, 结果显示, 鲤细胞因子不同家族, 以及相同家族不同成员之间的同源性均很低, 因此, 通过本研究获得的鲤细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 的多克隆抗体用于后续实验的定量检测将无交叉影响。

经琼脂糖凝胶电泳检测, 超螺旋环形的质粒比线性化质粒的迁移速率要快, 但是如果只是环形而无超螺旋结构, 则其迁移速率反而要比线性化的质粒慢(图2-a, b, d), 而这类质粒也同样能够成功合成融合蛋白^[15]。此外, 质粒电泳结果还与菌的生长周期有关, 所以本研究出现重组质粒的酶切结果与理论相悖现象的原因可能与其螺旋程度以及菌的生长周期相关。

本研究沿用前期的实验方法, 通过His Trap HP (GE)柱并使用单一浓度的咪唑溶液对合成的融合蛋白进行洗脱及纯化^[15], 该方法的优点是能够大量回收融合蛋白, 但其缺点是不能有效去除大肠杆菌中表达的其他杂蛋白, 以至于用该纯化蛋白制备抗体时, 其他杂蛋白也会产生相应的抗体。针对该问题, 可以通过咪唑溶液浓度梯度去除杂蛋白和洗脱融合蛋白等实验方案, 使获得的多克隆抗体中的有效成分最大化, 从而尽量去除杂蛋白对实验结果带来的影响。以纯化的融合蛋白作为抗原免疫新西兰长耳兔, 获得TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 多克隆抗体血清, ELISA方法检测抗血清效价均达到 2.4×10^6 , 与实验室之前制备的鲤营养素转载体多克隆抗体的效价相近^[23-24]。

以本实验制备的多克隆抗体作为工具, 检测嗜水气单胞菌感染后, 鲤血清中炎症细胞因子的合成变化。经ELISA方法检测结果显示, 在感染嗜水气单胞菌后, 细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 在蛋白质水平的合成量均显著高于阴性对照组($P < 0.05$)(图4), 表

明嗜水气单胞菌能引起鲤的炎症反应并产生免疫应答。这些检测结果既与水产养殖动物日本鳗鲡^[12]、尼罗罗非鱼^[13]在转录组水平的研究结果相似, 也与哺乳动物^[11]、家禽^[9]等在蛋白质水平的研究结果相同。研究表明, 本实验制备的鲤细胞因子多克隆抗体具有较高的亲和力和特异性。

综上所述, 通过本实验制备了具有较高亲和力和高特异性、高效价的鲤细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10和TGF- β 的多克隆抗体, 并可用于蛋白质水平的检测, 该结果为深入开展水产养殖动物免疫的相关研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Ige B A. Probiotics use in intensive fish farming[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(22): 2701-2711.
- [2] 曹泓. 基于多源光谱数据融合的水产养殖水质有机物浓度快速检测研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
Cao H. Research on rapid determination of organic matter concentration in aquaculture water using multi-source spectral data fusion[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014(in Chinese).
- [3] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017(in Chinese).
- [4] Ariole C N, Oha E C. Antimicrobial activity of estuarine isolates against shrimp pathogenic *Aeromonas species*[J]. Nature & Science, 2013, 11(2): 123-128.
- [5] Dallaire-Dufresne S, Tanaka K H, Trudel M V, et al. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 169(1-2): 1-7.
- [6] Khalil S R, Reda R M, Awad A. Efficacy of *Spirulina platensis* diet supplements on disease resistance and immune-related gene expression in *Cyprinus carpio* L. Exposed to herbicide atrazine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 119-128.
- [7] Matsumoto M, Araki K, Hayashi K, et al. Adjuvant effect of recombinant interleukin-12 in the Nocardiosis formalin-killed vaccine of the amberjack *Seriola dumer-*

- ili*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 263-269.
- [8] Molofsky A B, Savage A, Locksley R M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation[J]. Immunity, 2015, 42(6): 1005-1019.
- [9] Feng J C, Wang L H, Zhou L X, et al. Using *in vitro* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against *Salmonella* infection in broiler chicks[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147630.
- [10] Chen C Y, Tsen H Y, Lin C L, et al. Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the *Salmonella* invasion and inflammation of broiler chicks[J]. Poultry Science, 2012, 91(9): 2139-2147.
- [11] Chen C Y, Tsen H Y, Lin C L, et al. Enhancement of the immune response against *Salmonella* infection of mice by heat-killed multispecies combinations of lactic acid bacteria[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62: 1657-1664.
- [12] Birhanu B T, Lee J S, Lee S J, et al. Immunomodulation of *Lactobacillus pentosus* PL11 against *Edwardsiella tarda* infection in the head kidney cells of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 466-472.
- [13] Hamdan A M, El-Sayed A F M, Mahmoud M M. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(4): 1061-1073.
- [14] 侯彩霞. 鲤鱼肠道 $sglt1$ 的表达与抗体制备[D]. 新乡: 河南师范大学, 2011.
- Hou C X. Expression and antibody preparation of $sglt1$ from *Cyprinus carpio* L.[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2011 (in Chinese).
- [15] 冯军厂. 免疫活性乳酸菌的筛选及其抗肉鸡沙门氏菌感染的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- Feng J C. Using *in vitro* Immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against *Salmonella* infection in broiler chicks[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016(in Chinese).
- [16] Lin W H, Yu B, Lin C K, et al. Immune effect of heat-killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* invasion to mice[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(1): 22-31.
- [17] Bar-Shira E, Friedman A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(10): 930-941.
- [18] Withanage G S K, Kaiser P, Wigley P, et al. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(4): 2152-2159.
- [19] Hu Z Y, Wu B Q, Meng F H, et al. Impact of molecular hydrogen treatments on the innate immune activity and survival of zebrafish (*Danio rerio*) challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 554-560.
- [20] 王莉莉. Interleukin-12对小鼠NK细胞的调控作用及机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- Wang L L. The regulatory functions and mechanisms of Interleukin-12 treatment on NK cells in mice[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015 (in Chinese).
- [21] Fife M S, Gutierrez A, Ogilvie E M, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2006, 8(5): R148.
- [22] Taylor A, Verhagen J, Blaser K, et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells[J]. Immunology, 2006, 117(4): 433-442.
- [23] 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).
- [24] 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).

Preparation and detection of cytokines polyclonal antibodies of *Cyprinus carpio*

FENG Junchang, CHANG Xulu, ZHU Zhenxiang, GUO Xiangrui, ZHAO Yanjing,
LIU Huifen, ZHANG Jianxin, NIE Guoxing*

(Engineering Lab of Henan Province for Aquatic Animal Disease Control,
Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation,
College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Inflammatory cytokines are often used as one of the indicators to detect host immune responses. The lack of cytokines antibodies for fish has hindered analysis of cytokines protein expression by ELISA. In this paper, the fragments of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *IL-10* and *TGF- β* genes of *Cyprinus carpio*, containing partial antigenic determinants were cloned by PCR. The target sections of cytokines were cloned into plasmid pET-32a/21a vectors which had restriction sites for *BamH* I and *Hind* III. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The fusion proteins were highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after being induced with IPTG. The purified fusion proteins were used as antigen to immunize New Zealand Rabbits by ear margin veins injection combined with subcutaneous injection to obtain rabbit anti carp polyclonal antibodies of cytokines. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) was used to evaluate the antibody titers, and the antibodies were used as a test tool to detect the expression of inflammatory cytokines in carp serum after infection with *Aeromonas hydrophila*. The results showed that the sizes of fusion proteins were about 31.8, 31.7, 35.3, 32.5, 18.0 and 33.6 ku, respectively. The titers of the antiserum were about 2.4×10^6 . The pro-inflammatory cytokines *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12* and anti-inflammatory cytokines *IL-10* and *TGF- β* showed different expression patterns at different stages after *A. hydrophila* infection. The results indicated that the prepared antibodies performed high titer, affinity and specificity and could be applied to study the expression of cytokines in *C. carpio*. The availability of these polyclonal antibodies laid the foundation for the systematic study of immune response and cytokines expression in *C. carpio*. Meanwhile, these polyclonal antibodies could also be used to exploratively study the cytokines protein expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *IL-10* and *TGF- β* in other fishes.

Key words: *Cyprinus carpio*; cytokines; prokaryotic expression; antibody titer; pathogenic bacteria; ELISA

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

Funding projects: Innovation Scientists and Technicians Troop Construction Projects of Henan Province (CXTD2016043); Doctoral Fund of Henan Normal University (qd16155); Key Technology Research Project of Henan Province (172102110195, 172102210343); Key Research Projects of Henan Higher Education Institutions (17B240002, 16A240004); Youth Fund of Henan Normal University (2016QK23)