



黄颡鱼细胞因子信号传导抑制因子SOCS1的原核表达及多克隆抗体制备

叶汉梅, 魏晓雷, 谭肖英*

(华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 细胞因子信号传导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)是一类由细胞产生的胞内蛋白, 能够反馈性阻断细胞因子信号传导过程的负性调控因子。为深入研究黄颡鱼细胞因子信号传导的发生过程和机制, 实验从黄颡鱼cDNA中克隆获得561 bp的黄颡鱼SOCS1(*PfSOCS1*)基因编码序列, 成功构建了重组质粒pET32a(+)-*PfSOCS1*, 并转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中, 在不同温度、IPTG浓度、诱导时间等条件下进行表达, 确定最佳表达条件。本实验采用包涵体纯化的方法得到纯度较高的重组SOCS1蛋白; 以重组*PfSOCS1*蛋白免疫Balb/C小鼠, 制备多克隆抗体。通过Western blot鉴定了*PfSOCS1*抗血清可以特异性识别重组*PfSOCS1*蛋白。蛋白水平的组织分布显示, 黄颡鱼SOCS1蛋白在肝脏中表达水平较高。

关键词: 黄颡鱼; SOCS1; 原核表达; 多克隆抗体制备; 蛋白表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

细胞因子信号传导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)是一类胞内蛋白, 能够反馈性阻断细胞因子信号传导过程, 为胞内负性调控因子。迄今为止, 在哺乳动物中, SOCS家族至少由8个家族成员组成, 包括细胞因子诱导的含SH2蛋白(Cytokine inducible SH2-containing protein, CISH)和SOCS1-SOCS7^[1]。而在鱼类中, SOCS家族由12个家族成员组成, 除CISH和SOCS1-SOCS7外, 还包括: SOCS3b、SOCS5b、SOCS8和SOCS9^[2-3]。SOCS蛋白在细胞因子(IFN γ 、IL-4、IL-6、IL-12等)的诱导下依赖JAK/STAT信号通路激活产生, 继而负反馈调节细胞因子的信号转导, 在细胞的生长、分化和增殖等方面发挥重要作用^[4]。研究发现, SOCS家族蛋白在炎症性疾病、自身免疫病和肿瘤等疾病的发生发展上也发挥着重要的作用^[5]。SOCS1

作为SOCS家族重要的成员, 是第一个被发现的JAK信号通路抑制因子, 可直接抑制JAK1、JAK2和TYK2的催化活性, 负调控JAK / STAT信号通路, 还可以抑制NF-kB的催化活性, 负调控Toll样受体信号转导^[6-7]。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是我国内陆淡水地区重要的经济养殖鱼类, 本实验室克隆得到了黄颡鱼SOCS家族成员9个基因的cDNA全长序列(包括SOCS1)^[2]。多克隆抗体可以识别多个抗原位点、容易制备、成本低, 因此被广泛应用于免疫印迹、酶联免疫吸附实验(ELISA)、免疫组化等实验。但到目前为止, 还没有高质量的黄颡鱼SOCS1抗体, 很大程度限制了对黄颡鱼信号传导的深入研究。本实验通过构建黄颡鱼SOCS1原核表达载体, 纯化得到重组*PfSOCS1*蛋白, 并制备了鼠抗血清, 为深入研究黄颡鱼信号传导的过程和机

收稿日期: 2019-06-23 修回日期: 2019-09-18

资助项目: 国家自然科学基金(31572605); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900400); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队项目(T201933)

通信作者: 谭肖英, E-mail: txy7933@mail.hzau.edu.cn; txy7933@163.com

制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

5周龄SPF级Balb/C小鼠由华中农业大学实验动物中心提供; *E. coli* DH5 α 和*E. coli* Rosetta (DE3) 购自天根生物有限公司; 质粒pET32a(+)由本实验室保存; Ni-NTA预装重力柱(1 mL)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 弗氏佐剂购自Sigma公司; 黄颡鱼购自武汉市汉南区的五湖渔场。

1.2 实验方法

引物合成 根据黄颡鱼*SOCS1*基因序列的开放阅读框(ORF), 设计含有*EcoR* I 和*Xho* I 酶切位点的一步法克隆引物PfSOCS1。引物序列如下, PfSOCS1-F: 5'-GCTGATATCGGATCCGAATTCATGGTAGCGCACGGCGCC-3', PfSOCS1-R: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTAGAGCCGATATGGAAAAGAGTG-3'。下划线为酶切位点。

pET32a(+)-PfSOCS1重组表达载体的构建以黄颡鱼cDNA为模版, 设计PfSOCS1-R/F引物, 通过PCR扩增*PfSOCS1* ORF序列, 利用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收PCR产物。用*EcoR* I 和*Xho* I 限制性内切酶对pET-32a(+)质粒进行双酶切, 之后采用CloneExpress II One Step Cloning Kit将*SOCS1*基因连接到pET-32a(+)载体中。将pET32a(+)-PfSOCS1原核表达载体转化至DH5 α 大肠杆菌中进行PCR菌落鉴定和武汉擎科测序。

pET-32a(+)通用测序引物(T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'和T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3')。

重组PfSOCS1蛋白诱导表达 将测序正确的重组表达载体转化至*E. coli* Rosetta(DE3)大肠杆菌中, 菌落PCR鉴定阳性的菌落后, 取含重组质粒的菌液50 μ L, 接种至5 mL含有AMP的LB培养基中, 于37 $^{\circ}$ C、200 r/min培养至OD \approx 0.6, 加入IPTG至终浓度分别为0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C和200 r/min条件下诱导表达过夜。收集诱导表达后的菌体, 经SDS-PAGE鉴定成功表达后, 对菌体进行高压破碎, 4 $^{\circ}$ C下、12 000 r/min离心30 min后收集沉淀并进行SDS-PAGE鉴定。

重组PfSOCS1蛋白纯化 根据上述方法对转化重组质粒的大肠杆菌进行大量诱导表达, 离心收集沉淀, 重悬浮于结合液中, 4 $^{\circ}$ C超声破菌, 收集包涵体沉淀。利用包涵体纯化重组蛋白, 参照我们实验室在国内外学者研究的基础上建立的方法^[8]。纯化后的蛋白经超滤离心管浓缩后进行SDS-PAGE鉴定。

鼠抗PfSOCS1多克隆抗体的制备 将纯化的重组PfSOCS1蛋白分别与等量的完全弗氏佐剂混合, 充分乳化后, 经多点皮下注射免疫小鼠。每隔2周加强免疫1次, 使用同样剂量的重组蛋白和等量的不完全弗氏佐剂充分乳化后进行免疫, 共免疫4次。第4次免疫7 d后, 眼球取血, 4 $^{\circ}$ C下静置24 h, 5 000 r/min离心30 min, 吸取抗血清。

动物组织和细胞总蛋白提取 分别取黄颡鱼肾脏、肠道、肝脏和卵巢组织各0.5 g, 以及上述细胞样品, 用RIPA裂解液提取总蛋白, 经BCA法测定蛋白浓度后, 加入SDS上样缓冲液, 煮沸5 min, 于1 000 \times g离心5 min, 取上清进行Western blot检测。

Western blot检测 参照我们实验室在国内外学者研究的基础上建立的方法^[8-10]。分别将处理后的重组蛋白样品、黄颡鱼组织蛋白样品经SDS-PAGE电泳后, 置湿转电转仪(Bio-Red, 美国)转印至PVDF膜上, 用8%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭3 h, 一抗(鼠多抗PfSOCS1或兔多抗GAPDH)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗膜4次, 每次5 min, 加入HRP标记的IgG(鼠抗或兔抗, 1 : 4 000稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, TBST洗膜4次, 每次5 min, 采用ELC化学发光法检测并拍照。

2 结果

2.1 黄颡鱼SOCS1基因的克隆

根据已有*SOCS1*基因核心序列, 设计引物。以黄颡鱼肝脏cDNA作为模版, 进行RT-PCR, 扩增得到*PfSOCS1*目的片段。利用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 可见约为561 bp(图1)的条带。将重组载体pET32a(+)-PfSOCS1转化至DH5 α 的菌落中, 随机选取单克隆菌落, 进行菌液PCR验证。将阳性菌液送测序进行鉴定, 测序结果与GenBank中序列一致, 说明重组载体pET32a(+)-PfSOCS1构建成功。

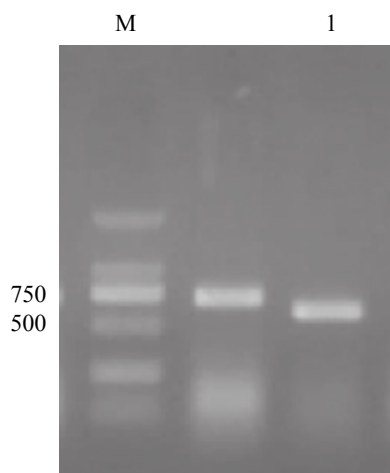


图1 *PfSOCS1*基因的PCR扩增结果

M: DM2000 DNA相对分子质量; 1: *PfSOCS1*基因目的条带

Fig. 1 PCR amplification of *PfSOCS1* gene

M: DNA Marker (DM2000); 1: Target gene of *PfSOCS1*

2.2 重组PfSOCS1蛋白的表达和纯化

将测序正确的pET32a(+)-PfSOCS1重组表达载体转化至*E. coli* Rosetta(DE3)表达菌株中, 在经过16 °C不同浓度IPTG诱导重组蛋白表达, 空载体pET32a(DE3)作为对照。SDS-PAGE结果显示, 相对于未经IPTG诱导的*E. coli* Rosetta(DE3)大肠杆菌, 经过IPTG诱导后, 在约38 ku(图2)处出现特异性目的条带, 表明重组表达载体pET32a(+)-

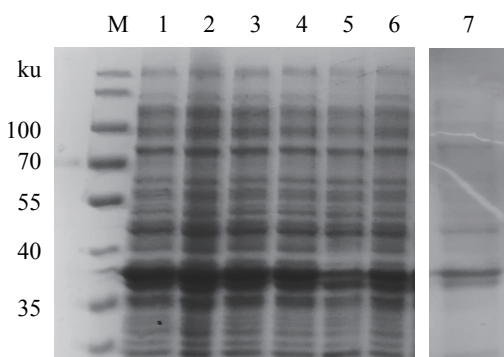


图2 重组PfSOCS1蛋白的表达和纯化的SDS-PAGE分析

M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 0.2 mmol/L IPTG诱导; 2. 0.4 mmol/L IPTG诱导; 3. 0.6 mmol/L IPTG诱导; 4. 0.8 mmol/L IPTG诱导; 5. 0 mmol/L IPTG诱导; 6. 1.0 mmol/L IPTG诱导; 7. 纯化后重组蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant *PfSOCS1* protein expressed and purified

M. Protein marker; 1. 0.2 mmol/L IPTG-induced; 2. 0.4 mmol/L IPTG-induced; 3. 0.6 mmol/L IPTG-induced; 4. 0.8 mmol/L IPTG-induced; 5. 0 mmol/L IPTG-induced; 6. 1.0 mmol/L IPTG-induced; 7. purified target protein.

PfSOCS1构建成功。在不同浓度IPTG诱导后, 重组PfSOCS1蛋白的表达量没有发生显著性变化, 因此本实验选择0.1 mmol/L IPTG, 16 °C下过夜诱导为最佳条件。大批量诱导后的*E. coli* Rosetta (DE3)大肠杆菌经过高压破碎后, 以包涵体纯化方式获得纯化重组PfSOCS1蛋白。经过SDS-PAGE分析, 得到了特异的单一条带, 表明成功纯化出重组PfSOCS1蛋白。

2.3 Western blot检测

经过4次免疫后, 获得鼠源PfSOCS1抗血清。通过Western blot检测制备的PfSOCS1抗血清与真核表达蛋白的结合情况, Western blot结果显示, 鼠源PfSOCS1抗体可以特异性识别重组PfSOCS1蛋白(图3)。

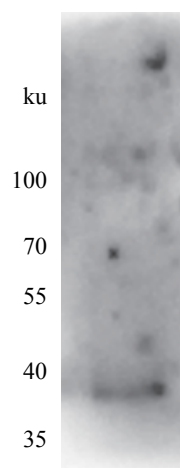


图3 Western blot检测重组PfSOCS1蛋白

Fig. 3 Detection of recombinant *PfSOCS1* protein using Western blot

用PfSOCS1抗血清检测黄颡鱼肾脏、肠道、肝脏和卵巢组织中的SOCS1蛋白表达水平(图4)。

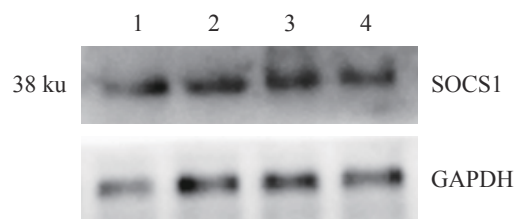


图4 Western blot检测黄颡鱼SOCS1组织分布

1. 肾脏; 2. 肠道; 3. 肝脏; 4. 卵巢。GAPDH作为内参蛋白

Fig. 4 Western blot analysis of *SOCS1* in different tissues

1. kidney; 2. intestine; 3. liver; 4. ovary. GAPDH served as a loading control

3 讨论

本研究首次对黄颡鱼SOCS1基因进行原核表达,并制备多克隆抗体。本实验为了充分利用资源来表达目的蛋白,选择pET32a(+)作为表达载体。经过IPTG诱导表达后,重组PfSOCS1蛋白以没有活性的包涵体形式存在。在实验过程中,我们通过尿素变性纯化重组蛋白,并加入1%的Triton X-100洗涤沉淀,使蛋白保持稳定。之后的实验中,我们采用弗氏佐剂作为免疫增强剂,经过4次免疫Balb/C小鼠获得的鼠源PfSOCS1抗体,根据Western blot检测结果分析,重组蛋白可被其免疫血清识别,PfSOCS1蛋白表观分子量为38 ku,具有较好的免疫原性,表明抗体制备成功,为后续深入研究黄颡鱼信号传导过程和调控机制奠定基础。

SOCS家族蛋白是经典JAK/STAT信号通路重要的负反馈调节因子,黄颡鱼SOCS1基因编码186个氨基酸,类似于哺乳动物,由于制备抗体的抗原是重组黄颡鱼SOCS1全长蛋白,理论上PfSOCS1抗体可以与其他SOCS家族成员发生交叉反应。

不同物种的SOCS家族蛋白在各个组织表达不尽相同。肝脏组织中较高的SOCS1 mRNA表达水平已经在黄颡鱼和鲮中有报道^[2, 11]。对比之下,Thanasaksiri等^[12]报道牙鲆肝脏组织中SOCS1的mRNA表达水平较其它组织低。本实验第一次检测了鱼类SOCS1的蛋白表达水平。我们用鼠抗PfSOCS1抗血清对黄颡鱼肾脏、肠道、肝脏和卵巢组织进行Western blot检测,发现SOCS1蛋白在肝脏组织中有较高表达。

参考文献:

- [1] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(6): 454-465.
- [2] Ye H M, Zhao T, Wu L X, et al. Molecular characterization of nine Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) genes from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their changes in mRNA expression to dietary carbohydrate levels[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 906-912.
- [3] Jin H J, Shao J Z, Xiang L X, et al. Global identification and comparative analysis of SOCS genes in fish: Insights into the molecular evolution of SOCS family[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(5): 1258-1268.
- [4] O'Sullivan L A, Noor S M, Trengove M C, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates embryonic myelopoiesis independently of its effects on T cell development[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186(8): 4751-4761.
- [5] Tsao J T, Kuo C C, Lin S C. The analysis of CIS, SOCS1, SOSC2 and SOCS3 transcript levels in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2008, 8(4): 179-185.
- [6] Liao N P D, Laktyushin A, Lucet I S, et al. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1558.
- [7] Yuan F H, Chen Y L, Zhao Y, et al. microRNA-30a inhibits the liver cell proliferation and promotes cell apoptosis through the JAK/STAT signaling pathway by targeting SOCS-1 in rats with sepsis[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(10): 17839-17853.
- [8] 魏晓雷, 叶汉梅, 罗智. 黄颡鱼自噬相关基因LC3B和Beclin1的原核表达及多克隆抗体制备[J]. *水生生物学学报*, 2019, 43(6): 1197-1202.
- Wei X L, Ye H M, Luo Z. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of autophagy-related genes LC3B and Beclin1 of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(6): 1197-1202(in Chinese).
- [9] Zhao T, Wu K, Hogstrand C, et al. Lipophagy mediated carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/PPAR γ pathways[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019.
- [10] Wei C C, Luo Z, Hogstrand C, et al. Zinc reduces hepatic lipid deposition and activates lipophagy via Zn²⁺/MTF-1/PPAR α and Ca²⁺/CaMKK β /AMPK pathways[J]. *The FASEB Journal*, 2018, 32(12): 6666-6680.
- [11] Song Y J, Cheng X X, Jiang X Y, et al. Identification and expression analysis of suppressors of cytokine signaling (SOCS) from soiny mullet (*Liza haematocheila*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 102-108.
- [12] Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H. Identification and expression analysis of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 145-152.

Prokaryotic protein expression of suppressor of cytokine signaling 1 of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and preparation of their polyclonal antibodies

YE Hanmei, WEI Xiaolei, TAN Xiaoying*

(Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Suppressor of cytokine signaling (SOCS) is a class of intracellular proteins that inhibited cytokine signaling. We cloned the sequence of *SOCS1* gene from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, whose length was 561 bp. We constructed the recombinant expression plasmid [pET32a (+)-SOCS1] carrying PfSOCS1 protein. The recombinant PfSOCS1 protein was optimally expressed by transformation into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and then highly purified under inclusion body conditions. The polyclonal anti-PfSOCS1 antibodies were prepared by immunizing Balb/C mouse with recombinant PfSOCS1 protein, which could be used to recognize recombinant PfSOCS1 protein by Western blotting. The protein expression of PfSOCS1 was detected in kidney, intestine, liver and ovary, with relatively predominant level in the liver in *P. fulvidraco*.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; SOCS1; prokaryotic expression; preparation of polyclonal antibody; protein expression

Corresponding author: TAN Xiaoying. E-mail: txy7933@mail.hzau.edu.cn; txy7933@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31572605); National Key R&D Program of China (2018YFD0900400); Project of Innovative Group for Excellent Young Scientists, Hubei Provincial Department of Education (T201933)