



草鱼 II 型干扰素的单克隆抗体制备与鉴定

朱晓真, 王俊亚, 贾钊, 王梓璇, 王邦杰, 邹钧*

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: II 型干扰素 (IFN- γ) 是参与辅助性 T 淋巴细胞 1 (Th1) 免疫应答的关键细胞因子之一。为研究产生 IFN- γ 和干扰素- γ 相关因子 (IFN- γ rel) 的细胞来源及功能差异, 实验构建原核表达质粒, 在大肠杆菌 DE3 中表达草鱼 (Ci)IFN- γ 和 CiIFN- γ rel 重组蛋白。结果显示, 重组 CiIFN- γ 蛋白为可溶性蛋白, 而 CiIFN- γ rel 蛋白则不可溶。通过亲和层析和分子筛层析获得了高纯度 CiIFN- γ 和 CiIFN- γ rel 重组蛋白, 免疫小鼠制备了单克隆抗体。通过 Western blotting 筛选获得 4 株特异性高、亲和力强的抗体。研究表明 CiIFN- γ 单克隆抗体与 CiIFN- γ rel 没有交叉反应, 反之亦然, 其中 FITC 标记的 2 株抗体可用于免疫荧光和流式细胞术分析。此外, Western blotting 分析显示, 草鱼 IFN- γ 和 IFN- γ rel 单克隆抗体不识别斑马鱼的同源 II 型干扰素蛋白。本研究制备了首个 IFN- γ rel 的单克隆抗体, 为深入研究草鱼 II 型干扰素的产生和生物学功能奠定基础。

关键词: 草鱼; II 型干扰素; 重组蛋白; 单克隆抗体; 免疫分析

中图分类号: Q 511; S 942

文献标志码: A

干扰素 (interferon, IFN) 是一类分泌性蛋白, 具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能。在四足动物中, 根据它们的受体、信号传导途径和生物学功能, 干扰素可被分为 3 大类, 即 I 型、II 型和 III 型^[1-4]。哺乳动物中, I 型和 III 型 IFN 包含多个成员, II 型 IFN 只有单个成员, 而真骨鱼类 (Teleost) II 型 IFN 含有 2 个成员, 即 IFN- γ 和干扰素- γ 相关因子 (IFN- γ related factor, IFN- γ rel)^[5]。

哺乳动物中, IFN- γ 主要由 CD4⁺ 辅助性 T 淋巴细胞 1 (Th1) 和自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 产生, 在调控 Th1 反应和激活巨噬细胞中发挥重要作用^[6]。IFN- γ 与受体结合后激活 JAK/STAT 介导的信号通路, 参与对多种病原的免疫应答, 与细胞的生长、成熟和分化密切相关^[7-9]。有颌脊椎动物 (Gnathostomata) IFN- γ 基因均具有保守的 4 个外显子/3 个内含子结构^[10], 每个外显子的大小

在不同物种之间有差异^[11-12]。研究发现, 除 IFN- γ 外, 大多数真骨鱼类存在第二个 II 型干扰素家族成员, 即 IFN- γ rel。迄今, IFN- γ rel 已经在以下几种鱼类中被鉴定, 如鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[13]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[14]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[15]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[16]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[17] 等。虽然 IFN- γ 与 IFN- γ rel 序列同源性较低, 但它们在基因组中彼此相邻, 且具有相同的基因结构, IFN- γ 在软骨鱼类 (Chondrichthyes) 中就存在, 而 IFN- γ rel 出现较晚, 仅存在于真骨鱼类中。因此, 一般认为, IFN- γ rel 是从 IFN- γ 复制而来^[14]。尽管序列同源性低, IFN- γ 与一些 IFN- γ rel 蛋白 C 端区域含有一个由赖氨酸或精氨酸组成的阳离子残基核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 基序。IFN- γ 的生物学功能已在部分鱼类中得到较深入的分析, 虹鳟

收稿日期: 2021-08-31 修回日期: 2021-09-30

资助项目: 国家自然科学基金 (32030112)

第一作者: 朱晓真 (照片), 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: m190100359@st.shou.edu.cn

通信作者: 邹钧, 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: jzhou@shou.edu.cn



(*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼和金鱼 IFN- γ 可以促进巨噬细胞一氧化氮 (NO) 的产生及吞噬细菌的能力^[12-14], 表明鱼类和哺乳动物 IFN- γ 具有类似的功能^[9]。作为真骨鱼类特有的 II 型干扰素家族成员, 不同物种的 IFN- γ rel 在应答细菌和病毒感染免疫反应中的合成和功能有一定差异^[18-19]。例如, 鲤 IFN- γ rel 主要由 IgM⁺ 细胞产生, 可能参与调节体液免疫。与哺乳动物 IFN- γ 不同, 鲤 IFN- γ rel 对头肾吞噬细胞中氧和氮自由基的产生没有诱导效应^[20]。但体外研究表明, 金鱼 IFN- γ rel 能诱导白细胞中干扰素受体和一氧化氮合酶的表达^[18]。

基于单克隆抗体的免疫学分析是研究细胞因子细胞来源和功能的重要手段。目前有关 IFN- γ 和 IFN- γ rel 单克隆抗体制备的报道很少。Yoon 等^[21] 用合成多肽作为免疫原制备了斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 IFN- γ 单克隆抗体, 该抗体可用于天然 IFN- γ 蛋白 Western blotting 检测分析^[21]。随后, Matsuura 等^[22] 通过真核系统表达的五条鰺 (*Seriola quinqueradiata*) IFN- γ 蛋白作为免疫原制备了单克隆抗体, 利用 Western blotting 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对白细胞中的内源性 IFN- γ 蛋白进行了测定。最近, Hu 等^[23] 用合成肽作为抗原, 制备虹鳟 IFN- γ 的单克隆抗体, 分析了感染后外周血白细胞中 IFN- γ ⁺ 细胞数量的变化。然而, 目前还没有关于 IFN- γ rel 单克隆抗体的报道。为探究草鱼 IFN- γ 和 IFN- γ rel 的细胞来源、免疫功能和信号传导途径, 本实验制备了高纯度的重组蛋白和单克隆抗体, 通过 Western blotting、免疫荧光和流式细胞术对单克隆抗体进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* Rosetta (DE3) 和 pET-21d (+)、pcDNA3.4、人胚胎肾细胞 293 (HEK293) 细胞由本实验室保存; 小鼠 (*Mus musculus*) 和小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 由北京华大蛋白质研发中心有限公司提供; His-Tagged Protein Purification Kit 购于江苏康为世纪生物科技股份有限公司; LipofectamineTM 3000 转染试剂盒购于 ThermoFisher (美国); StainBuffer 和 Cytotfix/Cytoperm Soln Kit 购于 BD Pharmingen 公司 (美国)。

1.2 实验方法

引物设计 用特异性引物 (表 1) 扩增草鱼

IFN- γ (AGQ16236.1) 和草鱼 IFN- γ rel (ACN56578.1) 基因的成熟肽。引物序列中加双划线的部分为酶切位点, 单划线为 His tag 序列, 为避免读码框移位, F 引物中添加了碱基 CT (加粗显示)。

表 1 *CiIFN- γ* 和 *IFN- γ rel* 基因重组质粒构建引物信息

Tab. 1 Primers for construction of *CiIFN- γ* and *IFN- γ rel* plasmids

基因名称 gene names	顺序 (5'-3') sequence (5'-3')
PET- γ F	CATG CCATGG CTAGCGTTCGGAAAAATCTGGAC
PET- γ R	CGGGAT CCCATCATCACCATCACCAT TTAGCTT TTCTGGCGCTTGATAC
PET- γ rel F	CATG CCATGG CTTTTCGCTTCCGCCGAGCAAAA AGC
PET- γ rel R	CGGGAT CC TTACTGAACCTTTTGTGTTTCTCGG

目的序列的扩增及重组质粒的构建 *CiIFN- γ* /IFN- γ rel 的重组载体质粒选用 pET-21d (+), 内切酶为 *Nco* I 和 *Bam*H I。用上述引物扩增目的基因, 将扩增得到的目的基因片段连接到 pMD-19T 载体上, 送苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。将验证后的质粒和 pET-21d (+) 质粒用 *Nco* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶于 37 °C 双酶切, 回收酶切产物并测定浓度后进行连接, 将连接反应液转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 通过 PCR 筛选阳性菌落送公司测序, 详细步骤参照本实验室已建立的方法^[24-25]。

原核重组蛋白的诱导表达与纯化 将构建的 pET-21d-*CiIFN- γ* 和 pET-21d-*CiIFN- γ rel* 质粒转化至 *E. coli* Rosetta (DE3), 经菌落 PCR 鉴定为阳性的菌落, 接种至 50 mL LB 培养基中培养过夜, 转移至 5 L LB 培养基中 37 °C 培养至 OD 值达到 0.6~0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白表达。*CiIFN- γ* 的诱导条件为 18 °C, *CiIFN- γ rel* 的诱导条件为 37 °C。经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析发现 *CiIFN- γ -His* 为可溶性蛋白, 按 His-Tagged Protein Purification Kit 说明书进行纯化。*CiIFN- γ rel* 重组蛋白为包涵体, 变性、复性及纯化方法详见参考文献^[24-25]。

单克隆抗体的制备与亚型鉴定 分别将 *CiIFN- γ* 和 *CiIFN- γ rel* 原核重组蛋白 (60 μ g/只) 皮下注射免疫 4 只 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 (命名为 1~4 号), 3 次加强免疫后测定血清效价。取小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞, 采用聚乙二醇融合法

(PEG法)进行融合。融合细胞用半固体培养基(含HAT)进行培养,用ELISA方法测定血清与抗原的亲合力。小鼠免疫和抗体ELISA筛选实验由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成,详细方法参考文献^[26]。

抗体筛选 分别将 *CiIFN- γ* 和 *CiIFN- γ rel* 编码区序列克隆至 pcDNA3.4 真核表达质粒上,内切酶为 *Bam*H I 和 *Hind* III, 获得 pcDNA3.4-*CiIFN- γ* 和 pcDNA3.4-*CiIFN- γ rel* 真核重组表达质粒。将贴壁 HEK293 细胞接种于 6 孔细胞培养板,用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒分别将 pcDNA3.4-*CiIFN- γ* 和 pcDNA3.4-*CiIFN- γ rel* 表达质粒转染至 HEK293 细胞中,于 37 °C 培养 38 h 后,加入蛋白分泌抑制剂 Brefeldin A (碧云天生物技术),继续培养 10 h。用 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)冰上裂解细胞,详细步骤参照本实验室前期建立的方法^[24-25],将提取的真核蛋白与原核重组蛋白 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(经亚型鉴定的鼠阳性杂交瘤细胞上清液,1:4 稀释)4 °C 孵育过夜,洗膜,二抗(山羊抗鼠 IgG,1:10 000)孵育 1 h,洗膜后用 Odyssey CLx 双色红外激光成像系统拍照成像。

抗体纯化与标记 用亲和层析法对抗体进行纯化,取 1 mg 纯化后的抗体用磷酸盐缓冲溶液(PBS)(pH 为 7.4)透析,加入 0.05 mol/L NaHCO₃ 调 pH 至 9.5,再与 FITC 荧光素连接,避光反应 2 h,12 000 r/min 高速离心去除变性蛋白,透析除去游离 FITC 并脱盐获得抗体与荧光素的复合物。抗体标记实验由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成,具体步骤参考 Qin 等^[27]。

抗体纯度与亲和常数测定 取上述纯化抗体,加入上样缓冲液 100 °C 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 2 min,SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度。用 ELISA 方法检测抗体亲和性,用 PBS 梯度稀释纯化抗体,空白对照为 PBS;加入二抗(山羊抗鼠 IgG/HRP,1:20 000),加入显色液,再加入终止液终止反应,测定双波长(450 nm,630 nm)吸光值。

草鱼与斑马鱼 II 型干扰素的交叉反应 分别将 *DrIFN- γ* (NP_998029.1) 和 *DrIFN- γ rel* (NP_001018629.1) 编码区序列克隆至 pcDNA3.4 真核表达质粒上,2 个内切酶为 *Bam*H I 和 *Hind* III, 获得 pcDNA3.4-*DrIFN- γ* 和 pcDNA3.4-*DrIFN- γ rel* 真核表达质粒。按上述方法将草鱼与斑马鱼质粒转染至 HEK293 细胞中。将裂解得到的蛋白进行 West-

ern blotting 分析,一抗为纯化的 GC4-IFN γ 、GC20-IFN γ 、GC9-IFN γ rel 和 GC21-IFN γ rel 抗体(体积比为 1:400)。

免疫荧光分析 按上述方法将 HEK293 细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔细胞培养板,转染 pcDNA3.4-*CiIFN- γ* 、pcDNA3.4-*CiIFN- γ rel* 或 pcDNA3.4 空载质粒。培养 48 h 后,弃培养基,用 PBS 清洗贴壁细胞 1 次,4% 多聚甲醛固定 15 min 后,用 PBS 清洗 2 次,用含 5% FBS、0.5% Triton X-100 的 PBS 处理 1 h,用此封闭通透液稀释 FITC 标记的抗体(体积比为 1:200),室温孵育 4 h,PBS 洗涤 3 次,随后 DAPI 孵育 15 min,经洗涤后,加入抗荧光淬灭剂,在激光共聚焦显微镜(Leica SP8)下观察、拍照成像。

流式细胞术分析 将 pcDNA3.4-*CiIFN γ* 、pcDNA3.4-*CiIFN γ rel* 质粒转染至 HEK293 细胞,培养 48 h 后,胰酶消化 2 min,重悬于 PBS 中,按 Cytofix/Cytoperm Soln Kit 说明书进行固定通透,抗体为上述纯化后 FITC 荧光标记的抗体,用 BD Perm/Wash™ Buffer 稀释至 300 μ L(体积比=1:200);同型抗体为 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG1(体积比为 1:500),4 °C 避光孵育 1 h。用 200 μ L Stain Buffer 重悬细胞,用流式细胞仪(BD Accuri™ C6 Plus)进行分析。

2 结果

2.1 *CiIFN- γ* 和 *CiIFN- γ rel* 原核重组蛋白的表达与纯化

将 pET-21d-*CiIFN- γ* 和 pET-21d-*CiIFN- γ rel* 转化至 *E. coli* Rosetta (DE3),加入 1 mmol/L IPTG,在适宜温度(*CiIFN- γ* 为 18 °C,*CiIFN- γ rel* 为 37 °C)下诱导蛋白表达。诱导后的 *E. coli* Rosetta (DE3) 经过高压破碎后进行 SDS-PAGE 分析,结果显示 *CiIFN- γ* 为可溶蛋白(图 1-a),而 *CiIFN- γ rel* 则为不可溶蛋白(图 1-b)。分别用镍柱亲和层析及分子筛层析获得 *CiIFN- γ* 和 *CiIFN- γ rel* 原核重组蛋白,SDS-PAGE 分析显示,*CiIFN- γ* 和 *CiIFN- γ rel* 重组蛋白均为单一条带,表明重组蛋白纯度较高。

2.2 免疫小鼠的血清效价测定与单克隆抗体亚型鉴定

ELISA 检测血清效价结果显示,4 号 *CiIFN- γ* (图 2-a) 和 1 号 *CiIFN- γ rel* (图 2-b) 在 128 000 倍数稀释时呈现良好的亲和力,因此,选取 4 号 *CiIFN- γ*

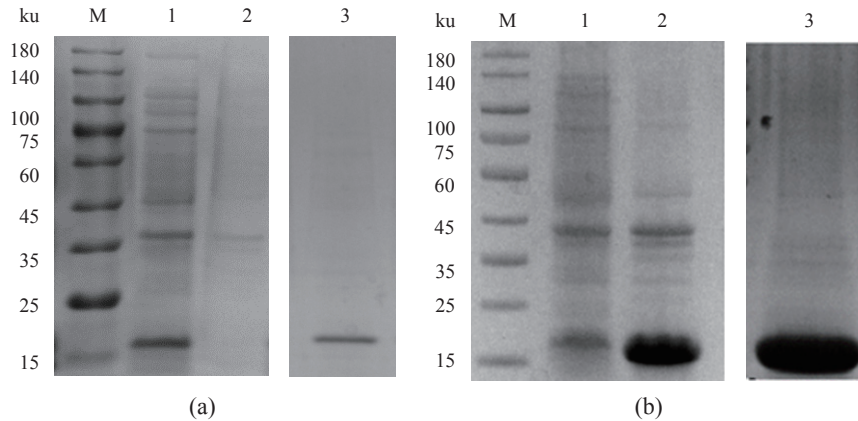


图 1 重组 CiIFN- γ (a) 和 CiIFN- γ rel (b) 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子量标准, 1. DE3 菌液上清液, 2. DE3 菌液沉淀, 3. 纯化后的重组蛋白; 下同

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant CiIFN- γ (a) and CiIFN- γ rel (b) proteins

M. protein marker, 1. supernatant of DE3 bacterial lysate, 2. DE3 bacterial pellet, 3. purified recombinant protein; the same below

和 1 号 CiIFN- γ rel 小鼠进行细胞融合和单抗制备。经 ELISA 筛选后各获得 9 株 CiIFN- γ 和 IFN- γ rel 阳性杂交瘤细胞株, 所有 CiIFN- γ 阳性杂交瘤细胞株均为 IgG1 亚型 (表 2), IFN- γ rel 阳性杂交瘤

细胞株有 6 株 IgG1 亚型 (1、5、8、9、13、21) 和 3 株 IgG2b 亚型 (4、15、19) (表 3), 表中阴性对照为 SP2/0 培养上清液, 阳性对照为免疫后的小鼠血清。

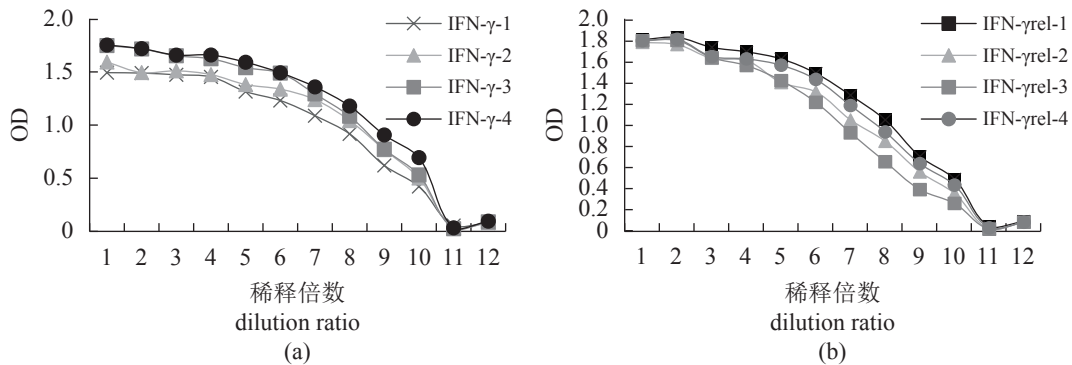


图 2 免疫小鼠血清中抗体效价测定

1. 200, 2. 400, 3. 800, 4. 1 600, 5. 3 200, 6. 6 400, 7. 12 800, 8. 25 600, 9. 51 200, 10. 102 400, 11. 空白对照 (PBS), 12. 阴性对照 (SP2/0 培养上清液)

Fig. 2 Determination of serum antibody titers in immunized mice

1. 200, 2. 400, 3. 800, 4. 1 600, 5. 3 200, 6. 6 400, 7. 12 800, 8. 25 600, 9. 51 200, 10. 102 400, 11. blank (PBS), 12. negative (culture supernatant of SP2/0)

2.3 单克隆抗体的筛选与纯化

单克隆抗体的筛选 将 CiIFN- γ 和 CiIFN- γ rel 原核重组蛋白及真核重组蛋白作为抗原, 用经亚型鉴定的鼠阳性杂交瘤细胞上清液 (1 : 4 稀释) 进行 Western blotting 分析。结果显示, CiIFN- γ 重组原核蛋白 (图 3-a) 以及 CiIFN- γ rel 重组原核蛋白 (图 3-c) 与其免疫小鼠的阳性杂交瘤细胞上清液均发生特异性结合。CiIFN- γ 的 4 号和 20 号抗体 (图 3-b)、CiIFN- γ rel 的 9 号和 21 号抗体

(图 3-d) 能够识别 HEK293 细胞中表达的 CiIFN- γ 和 CiIFN- γ rel 重组蛋白, 因此选择这 4 株抗体进行纯化与标记, 并将它们分别命名为 GC4-IFNg、GC20-IFNg 和 GC9-IFNgrel、GC21-IFNgrel。

单克隆抗体纯度检测 SDS-PAGE 电泳结果表明, 抗体纯度均高于 90%, 每株抗体均含重链 (55 ku) 和轻链 (25 ku) 2 条链, 与小鼠免疫球蛋白重链和轻链的理论值相符 (图 4)。

用 ELISA 方法检测了抗体的亲和常数, 根据参考文献^[28] 简化得到的亲和常数计算公式, 亲和

表 2 *CiIFN- γ* 杂交瘤细胞株效价测定及亚型鉴定

Tab. 2 Titer determination and subtype identification of

<i>CiIFN-γ</i> hybridoma cells lines					
编号 no.	OD值 OD value	抗体亚型 Ig subtype	编号 no.	OD值 OD value	抗体亚型 Ig subtype
4	0.812	G1	18	0.647	G1
5	0.840	G1	20	0.674	G1
10	0.794	G1	22	0.621	G1
12	0.462	M	阴性 negative control	0.040	-
14	0.777	G1	PBS	0.028	-
15	0.461	G1	阳性 positive control	1.011	-
16	0.570	G1			

表 3 *CiIFN- γ rel* 杂交瘤细胞株效价测定及亚型鉴定

Tab. 3 Titer determination and subtype identification of

<i>CiIFN-γrel</i> hybridoma cells lines					
编号 no.	OD值 OD value	抗体亚型 Ig subtype	编号 no.	OD值 OD value	抗体亚型 Ig subtype
1	0.275	G1	15	0.429	G2b
4	0.617	G2b	17	0.482	M
5	0.277	G1	19	0.734	G2b
8	0.454	G1	21	0.331	G1
9	0.572	G1	阴性 negative control	0.033	-
11	0.273	A	PBS	0.017	-
13	0.462	G1	阳性 positive control	0.716	-

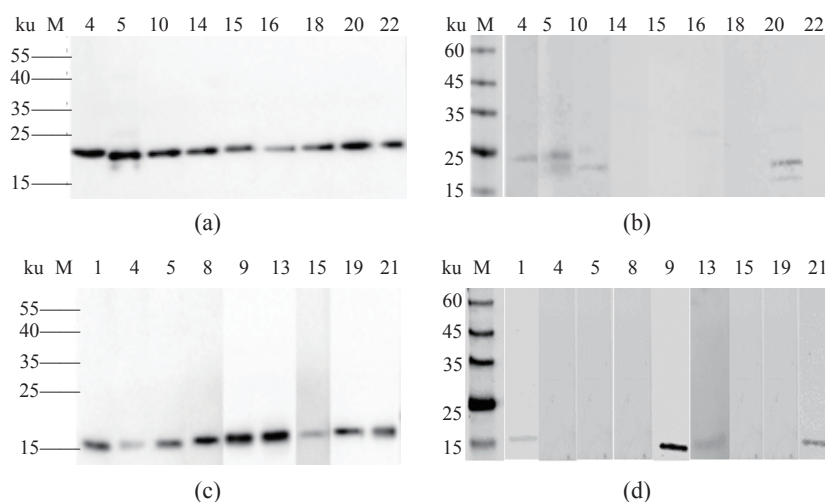


图 3 单克隆抗体筛选

(a) *CiIFN- γ* 重组原核蛋白; (b) *CiIFN- γ* 重组真核蛋白; (c) *CiIFN- γ rel* 重组原核蛋白; (d) *CiIFN- γ rel* 重组真核蛋白。序号表示为单克隆细胞编号, 同表 2 和表 3

Fig. 3 Screening of monoclonal antibodies

(a) *CiIFN- γ* recombinant prokaryotic protein; (b) *CiIFN- γ* recombinant eukaryotic protein; (c) *CiIFN- γ rel* recombinant prokaryotic protein; (d) *CiIFN- γ rel* recombinant eukaryotic protein. Numbers of antibody clones are described in Tab. 2 and Tab. 3

常数=150 000 \times A/抗体浓度 (A 代表上平台的 1/2 OD 值所对应的抗体稀释倍数), GC4-IFN γ 、GC20-IFN γ 、GC9-IFN γ rel 和 GC21-IFN γ rel 抗体的浓度分别为 2.6、2.0、2.2 和 1.8 mg/mL。结果显示, GC4-IFN γ (图 5-a)、GC20-IFN γ (图 5-b)、GC9-IFN γ rel (图 5-c)和 GC21-IFN γ rel (图 5-d) 的亲亲和常数分别为 5.91×10^9 、 3.84×10^9 、 6.98×10^9 和 8.53×10^9 L/mol, 表明纯化的 4 株抗体亲和力都较好。因此, 用 FITC 荧光染料对 GC20-IFN γ 和 GC9-IFN γ rel 进行了标记。

2.4 交叉反应分析

草鱼和斑马鱼均属于鲤科 (Cyprinid) 鱼类,

亲缘关系较近, 蛋白顺序相似率较高^[17] (表 4)。为明确制备的抗体能否识别斑马鱼 IFN- γ 和 IFN- γ rel 蛋白, 实验构建了斑马鱼真核表达质粒 (pcDNA3.4-*DrIFN- γ* 和 pcDNA3.4-*DrIFN- γ rel*), 在 HEK293 细胞中表达斑马鱼 IFN- γ 和 IFN- γ rel 真核蛋白, 进行 Western blotting 分析。结果显示, 制备的抗体具有很好的种属特异性, GC4-IFN γ (图 6-a) 和 GC20-IFN γ (图 6-b) 不识别斑马鱼 IFN- γ 真核重组蛋白, 此外, GC4-IFN γ 抗体仅检测到 1 条约 23 ku 的 *CiIFN- γ* 真核重组蛋白条带, 但 GC20-IFN γ 抗体检测出 2 个条带 (23 和 19.6 ku), *CiIFN- γ* 的理论分子量为 19.6 ku, 表明在 HEK293 细胞中表达的 *CiIFN- γ* 至少存在 2 种形式。同样,

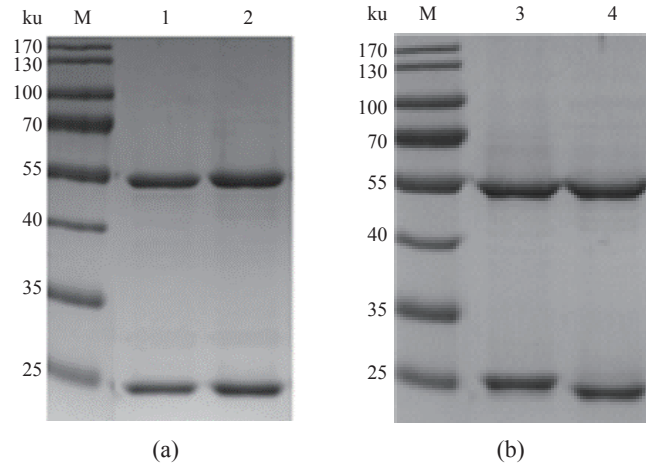


图4 SDS-PAGE 检测抗体纯度

1. GC4-IFNg, 2. GC20-IFNg, 3. GC9-IFNgrel, 4. GC21-IFNgrel

Fig. 4 SDS-PAGE of purified antibodies

1. GC4-IFNg, 2. GC20-IFNg, 3. GC9-IFNgrel, 4. GC21-IFNgrel

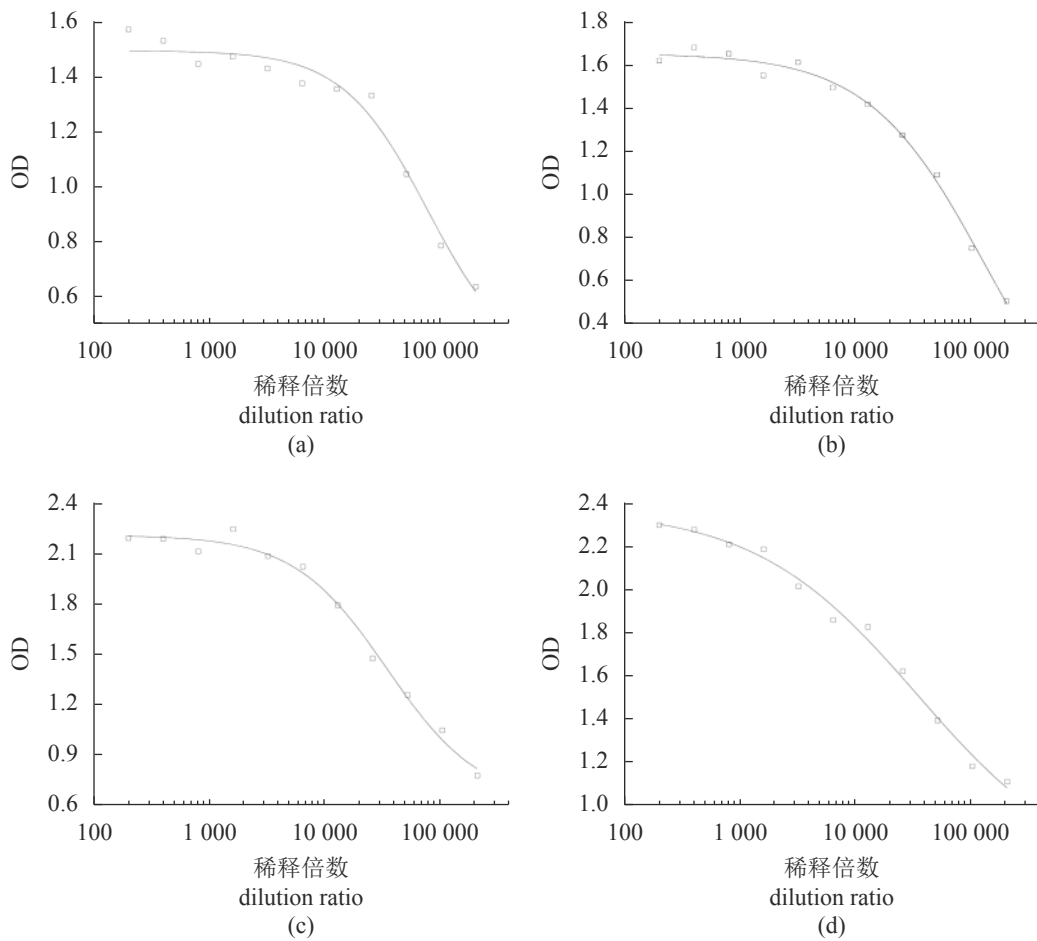


图5 ELISA 检测抗体的亲和常数

(a) GC4-IFNg, (b) GC20-IFNg, (c) GC9-IFNgrel, (d) GC21-IFNgrel, 下同

Fig. 5 Affinity of antibodies detected by ELISA

(a) GC4-IFNg, (b) GC20-IFNg, (c) GC9-IFNgrel, (d) GC21-IFNgrel, the same below

表 4 *CiIFN-γ/CiIFN-γrel* 与 *DrIFN-γ/DrIFN-γrel* 的一致性 (左下) 和相似性 (右上)

Tab. 4 Identity (lower left) and similarity (upper right) between *CiIFN-γ/CiIFN-γrel* and *DrIFN-γ/DrIFN-γrel* %

基因 genes	<i>CiIFN-γ</i>	<i>CiIFN-γrel</i>	<i>DrIFN-γ</i>	<i>DrIFN-γrel</i>
<i>CiIFN-γ</i>		41	93	43
<i>CiIFN-γrel</i>	21		41	76
<i>DrIFN-γ</i>	83	18		41
<i>DrIFN-γrel</i>	23	60	21	

CiIFN-γrel 抗体与 *DrIFN-γrel* 真核蛋白无交叉反应, 但在检测 *CiIFN-γrel* 真核蛋白时发现, GC9-IFN-grel (图 6-c) 抗体检测到 2 条明显条带 (18 和 23 ku), GC21-IFN-grel (图 6-d) 抗体除了检测到上述 2 条条带外, 还检测到了约 35 ku 的条带, 而 *CiIFN-γrel* 真核重组蛋白理论分子量为 18 ku。

2.5 免疫荧光分析

将 *CiIFN-γ/IFN-γrel* 真核表达质粒转染至 HEK293 细胞中, 与 FITC 标记的 GC20-IFN γ 和

GC9-IFN γ rel 孵育, 对照组为转染 pcDNA3.4 空载质粒的细胞。用 DAPI 对细胞核染色。结果显示, GC20-IFN γ 和 GC9-IFN γ rel 单克隆抗体均能识别相对应的细胞因子, 并且识别的蛋白位于细胞质中; 而对照组并没有发现特异性荧光信号, 表明本实验制备的单克隆抗体具有良好的特异性, 可用于免疫荧光来检测 *CiIFN-γ* 和 IFN- γ rel 分泌细胞 (图版)。

2.6 流式细胞术分析

将 *CiIFN-γ/IFN-γrel* 真核质粒转染至 HEK293 细胞中, 用 FITC 标记的 GC20-IFN γ 和 GC9-IFN-grel 进行孵育, 同型抗体为 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG1, 分析单克隆抗体在流式细胞术的检测效率。结果显示, GC20-IFN γ 和 GC9-IFN γ rel 均能特异性识别转染质粒的阳性细胞, 并且具有良好的分群效果, 阳性率分别为 19.0% (图 7-d) 和 15.1% (图 7-h); 而 IgG1-FITC 同型对照抗体孵育转染 *CiIFN-γ/IFN-γrel* 真核质粒的 HEK293 细胞, 未检测到阳性细胞 (图 7-b, f)。

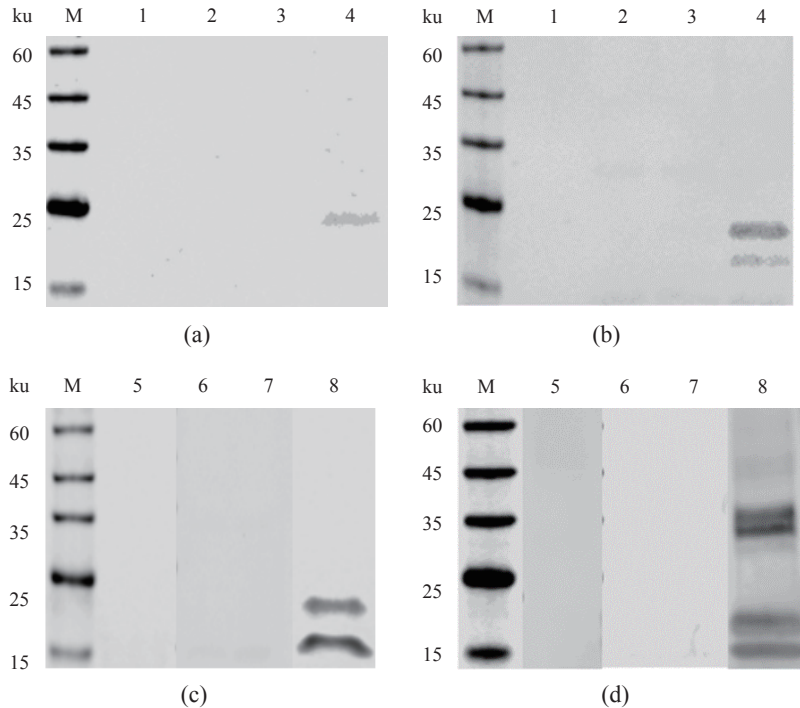
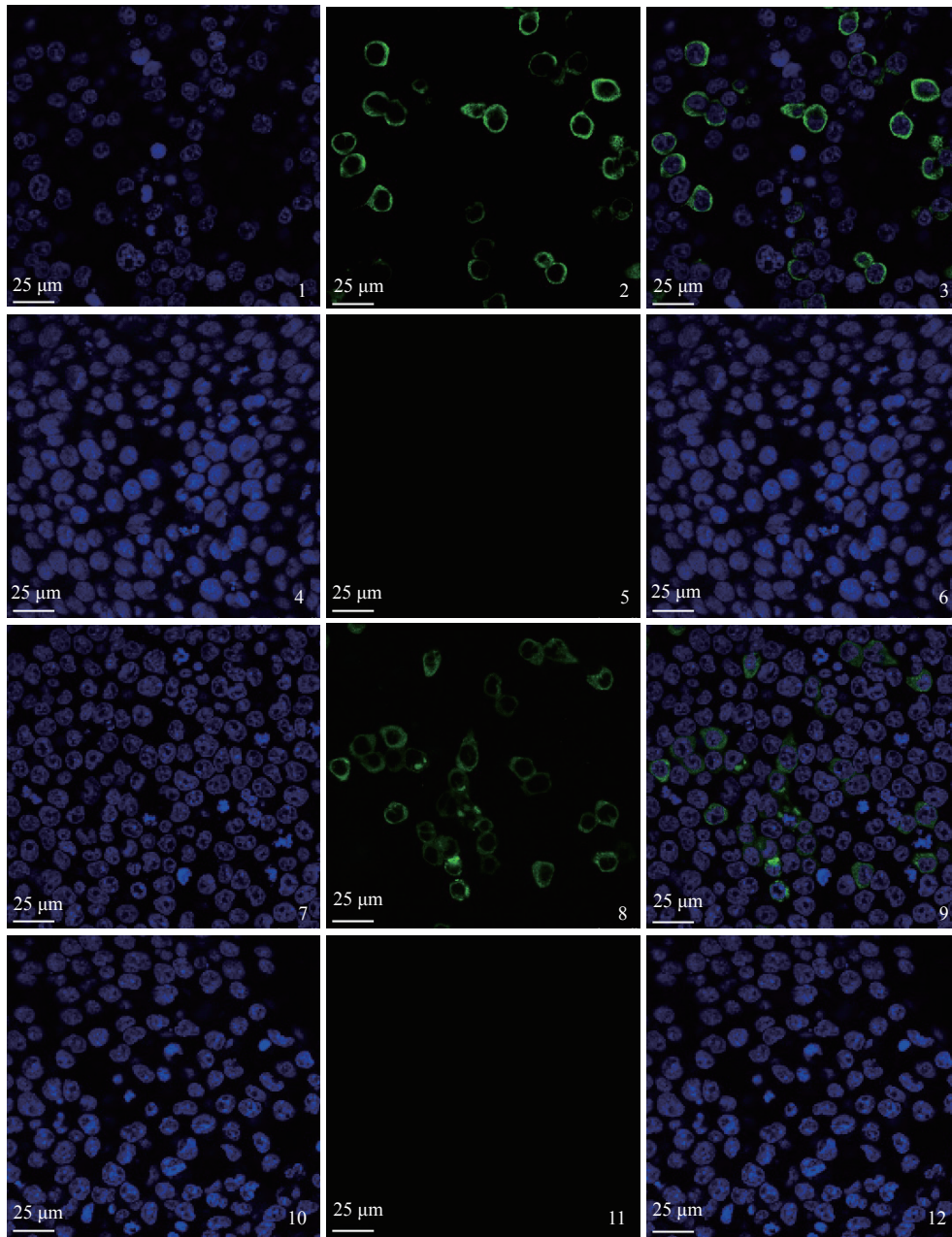


图 6 草鱼 II 型干扰素抗体与斑马鱼 II 型干扰素的交叉反应

1. 转 pcDNA3.4-*DrIFN-γrel* 质粒; 2. 转 pcDNA3.4-*CiIFN-γrel* 质粒; 3. 转 pcDNA3.4-*DrIFN-γ* 质粒; 4. 转 pcDNA3.4-*CiIFN-γ* 质粒; 5. 转 pcDNA3.4-*CiIFN-γ* 质粒; 6. 转 pcDNA3.4-*DrIFN-γ* 质粒; 7. 转 pcDNA3.4-*DrIFN-γrel* 质粒; 8. 转 pcDNA3.4-*CiIFN-γrel* 质粒

Fig. 6 Cross reaction of *C. idella* antibodies with *D. rerio* type II interferons

1. pcDNA3.4-*DrIFN-γrel*; 2. pcDNA3.4-*CiIFN-γrel*; 3. pcDNA3.4-*DrIFN-γ*; 4. pcDNA3.4-*CiIFN-γ*; 5. pcDNA3.4-*CiIFN-γ*; 6. pcDNA3.4-*DrIFN-γ*; 7. pcDNA3.4-*DrIFN-γrel*; 8. pcDNA3.4-*CiIFN-γrel*



图版 GC20-IFN γ 和 GC9-IFN γ rel 抗体的免疫荧光分析

1-3. 转 pcDNA3.4-C α IFN- γ 质粒; 4-6、10-12. 转 pcDNA3.4 空载质粒; 7-9. 转 pcDNA3.4-C α IFN- γ rel 质粒; 1、4、7 和 10. DAPI 染色; 2 和 5. FITC 标记的 GC20-IFN γ 染色; 8 和 11. FITC 标记的 GC9-IFN γ rel 染色; 3、6、9 和 12. 叠加复合图

Plate Immunofluorescence analysis of GC20-IFN γ and GC9-IFN γ rel antibodies

1-3. pcDNA3.4-C α IFN- γ ; 4-6, 10-12. pcDNA3.4; 7-9. pcDNA3.4-C α IFN- γ rel; 1, 4, 7 and 10. DAPI; 2 and 5. FITC labeled GC20-IFN γ ; 8 and 11. FITC labeled GC9-IFN γ rel; 3, 6, 9 and 12. merged image

3 讨论

哺乳动物中, II 型干扰素家族只有单个成员(即 IFN- γ), IFN- γ 主要由 CD4⁺ Th1 细胞和 NK 细胞产生, 在调控 Th1 反应和激活巨噬细胞中发挥重要作用^[6]。与哺乳类不同, 真骨鱼类 II 型干扰素家族包含 2 个成员, 即 IFN- γ 和 IFN- γ rel。研究

发现, 鲤 IFN- γ rel 主要由 IgM⁺ 细胞产生, 推测其参与调节体液免疫^[20]。

由于缺乏针对这 2 种细胞因子的特异性检测抗体, IFN- γ 和 IFN- γ rel 细胞因子的蛋白水平研究一直受到阻碍, 明确 IFN- γ 和 IFN- γ rel 分泌的细胞类型和数量, 对充分了解它们的调控功能非常重要。因此, 本实验选择 pET-21d (+) 作为表达载

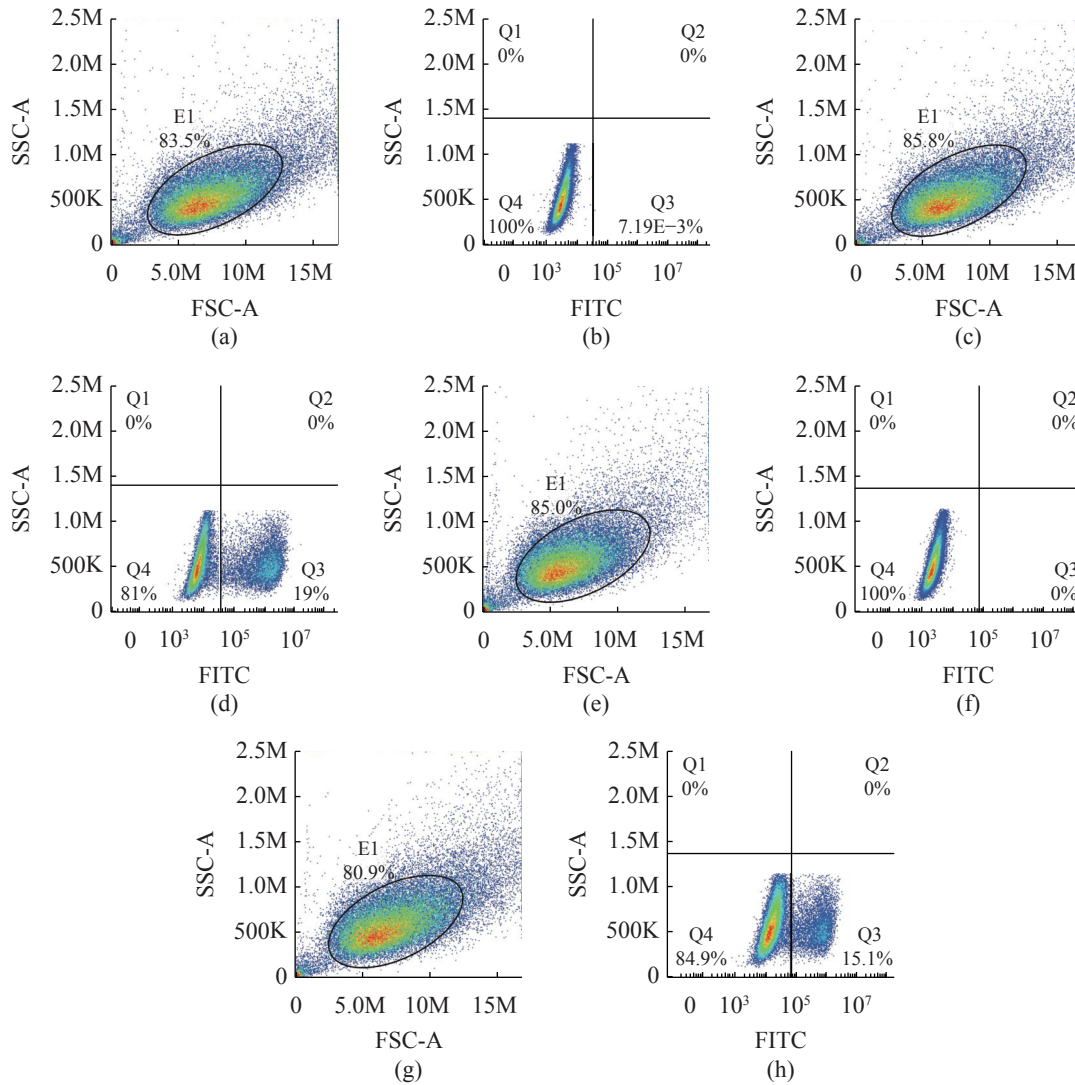


图 7 GC20-IFN γ 和 GC9-IFN γ rel 抗体的流式细胞术分析

(a)~(d). 转染 pcDNA3.4-CiIFN- γ 真核质粒; (e)~(h). 转染 pcDNA3.4-CiIFN- γ rel 真核质粒; (a), (c), (e), (g) 分别表示 IgG1-FITC、GC20-IFN γ 、IgG1-FITC、GC9-IFN γ rel 抗体染色的 HEK293 细胞群门 (E1); (b), (d), (f), (h) 分别表示 IgG1-FITC、GC20-IFN γ 、IgG1-FITC、GC9-IFN γ rel 抗体染色的阳性率; 其中 SSC-A 代表侧向散射; FSC-A 代表前向散射; 蓝色-橙色代表细胞的递增

Fig. 7 Flow cytometry analysis of GC20-IFN γ and GC9-IFN γ rel antibodies

(a)~(d). pcDNA3.4-CiIFN- γ ; (e)~(h). pcDNA3.4-CiIFN- γ rel; (a), (c), (e), (g). the cell populations (E1) of HEK293 cells stained with IgG1-FITC, GC20-IFN γ , IGg1-FITC and GC9-IFN γ rel antibodies, respectively; (b), (d), (f), (h). the percentages of positive cells using IgG1-FITC, GC20-IFN γ , IGg1-FITC and GC9-IFN γ rel, respectively; SSC-A stands for lateral scattering; FSC-A stands for forward scattering; blue-orange indicates increases of cell numbers

体对草鱼 *IFN- γ /IFN- γ rel* 基因进行原核表达, 通过亲和层析和分子筛层析获得了高纯度 IFN- γ 和 IFN- γ rel 原核重组蛋白, 并分别免疫小鼠制备了单克隆抗体。目前鱼类中还没有 IFN- γ rel 的单克隆抗体, 因此, 本研究制备的草鱼 IFN- γ 和 IFN- γ rel 单克隆抗体将为深入研究草鱼 II 型干扰素的免疫学功能和 Th1 免疫反应奠定基础。

Western blotting 结果显示, GC4-IFN γ 抗体检测到 1 条约 23 ku 的蛋白条带, 但 GC20-IFN γ 抗体可检测出 2 个蛋白条带 (23 和 19.6 ku), 表明这

2 株抗体可能识别不同形式的 IFN- γ 蛋白, 同时也暗示 IFN- γ 可能存在多种形式的翻译后修饰。在人体内, IFN- γ 有糖基化现象, 以 25、20 和 15.5 ku 3 种单体存在^[29]。鲷白细胞中也可检测到 2 个不同大小的 IFN- γ 条带^[22]。因此, 可以推测草鱼 IFN- γ 可能也存在不同形式的糖基化修饰。与 IFN- γ 类似, Western blotting 亦能检测到不同大小的 CiIFN- γ rel 真核重组蛋白 (18、23 和 35 ku), CiIFN- γ rel 的分子量理论值为 18 ku, 由此推测 35 ku 的蛋白可能为二聚体, 但也不能排除有蛋白修饰的

可能。*CiIFN- γ rel* 蛋白顺序中没有预测到 N-糖基化位点, 有可能受其他类型翻译后修饰(如 O-糖基化等)。总之, 23 和 35 ku 蛋白条带需要进一步验证。

CiIFN- γ 和 *DrIFN- γ* 序列一致性高达 83%, *CiIFN- γ rel* 和 *DrIFN- γ rel* 的序列一致性为 60%, 但 Western blotting 显示, 制备的草鱼单克隆抗体没有物种间的交叉反应, 表明单克隆抗体识别的特定抗原表位位于不保守的区域。*CiIFN- γ* 与 *CiIFN- γ rel* 之间的序列一致性低, 仅有 21%, 因此, *CiIFN- γ* 与 *CiIFN- γ rel* 抗体没有交叉反应。这些结果表明, 本实验制备的单克隆抗体特异性高。

最近, Hu 等^[23]用虹鳟 IFN- γ 单克隆抗体对外周白细胞进行间接胞内染色, 可以检测到内源性的 IFN- γ 蛋白, 初步探究了杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 感染后外周血白细胞中 IFN- γ ⁺ 细胞的数量变化, 并通过免疫组化分析明确了 IFN- γ ⁺ 细胞在脾脏和头肾中的分布。本研究制备的 FITC 标记的 2 株单克隆抗体可用于胞流式细胞术和免疫荧光分析检测表达 *CiIFN- γ* 与 *CiIFN- γ rel* 的 HEK293 细胞, 提示这 2 株抗体也可用于草鱼内源 IFN- γ 和 IFN- γ rel 分泌细胞的检测, 为深入研究 IFN- γ 和 IFN- γ rel 的细胞和组织来源奠定基础。

综上所述, 本实验获得了高纯度重组 IFN- γ 和 IFN- γ rel 蛋白, 制备了单克隆抗体。通过 Western blotting 筛选获得了 4 株特异性高、亲和力好的抗体, 可用于免疫荧光和流式细胞术分析。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20047-20051.
- [2] Savan R, Ravichandran S, Collins J R, *et al.* Structural conservation of interferon gamma among vertebrates[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(2): 115-124.
- [3] Qi Z T, Nie P, Secombes C J, *et al.* Intron-containing type I and type III IFN coexist in amphibians: refuting the concept that a retroposition event gave rise to type I IFNs[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 184(9): 5038-5046.
- [4] Fu J P, Chen S N, Zou P F, *et al.* IFN- γ in turtle: conservation in sequence and signalling and role in inhibiting iridovirus replication in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(1): 87-95.
- [5] Zou J, Secombes C J. Teleost fish interferons and their role in immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376-1387.
- [6] Boehm U, Klamp T, Groot M, *et al.* Cellular responses to interferon- γ [J]. *Annual Review of Immunology*, 1997, 15: 749-795.
- [7] Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, *et al.* Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75(2): 163-189.
- [8] Yang K, Zhang S N, Chen D Y, *et al.* IFN- γ -activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1635-1641.
- [9] Goossens K E, Ward A C, Lowenthal J W, *et al.* Chicken interferons, their receptors and interferon-stimulated genes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(3): 370-376.
- [10] Krause C D. Intron loss in interferon genes follows a distinct set of stages, and may confer an evolutionary advantage[J]. *Cytokine*, 2016, 83: 193-205.
- [11] Robertsen B, Bergan V, Røkenes T, *et al.* Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2003, 23(10): 601-612.
- [12] Zou J, Carrington A, Collet B, *et al.* Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish[J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(4): 2484-2494.
- [13] Li L, Chen S N, Laghari Z A, *et al.* Receptor complex and signalling pathway of the two type II IFNs, IFN- γ and IFN- γ rel in mandarin fish or the so-called Chinese perch *Siniperca chuatsi*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 97: 98-112.
- [14] Grayfer L, Belosevic M. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(2): 235-246.
- [15] Milev-Milovanovic I, Long S, Wilson M, *et al.* Identific-

- ation and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish[J]. *Immunogenetics*, 2006, 58(1): 70-80.
- [16] Stolte E H, Savelkoul H F J, Wiegertjes G, *et al.* Differential expression of two interferon- γ genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(12): 1467-1481.
- [17] Chen W Q, Xu Q Q, Chang M X, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of the IFN-gamma related gene (IFN- γ rel) in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2010, 134(3-4): 199-207.
- [18] Grayfer L, Garcia E G, Belosevic M. Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(31): 23537-23547.
- [19] Liao Z W, Wan Q Y, Su J G. Bioinformatics analysis of organizational and expressional characterizations of the IFNs, IRFs and CRFBs in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 61: 97-106.
- [20] Arts J A J, Tijhaar E J, Chadzinska M, *et al.* Functional analysis of carp interferon- γ : evolutionary conservation of classical phagocyte activation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 793-802.
- [21] Yoon S, Alnabulsi A, Wang T Y, *et al.* Analysis of interferon gamma protein expression in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 79-86.
- [22] Matsuura Y, Takano T, Matsuyama T, *et al.* Development of a method to quantify endogenous IFN γ protein in amberjack species[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 107: 251-259.
- [23] Hu Y F, Alnabulsi A, Alnabulsi A, *et al.* Characterisation and analysis of IFN-gamma producing cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 117: 328-338.
- [24] 王伟. 草鱼白细胞介素-15(IL-15) 及其受体 IL-2R β 的鉴定和功能分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020. Wang W. Identification and functional analysis of interleukin-15 (IL-15) and IL-2R β in grass carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [25] 徐佳文. 草鱼白细胞介素 21 及其受体 IL-21R α 的鉴定和功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020. Xu J W. Identification and function of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) interleukin 21 and its receptor IL-21R α [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [26] 杨文婷. 抗猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及功能验证 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019. Yang W T. Preparation and functional confirmation of monoclonal antibodies against porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2019 (in Chinese).
- [27] Qin Y T, Sun Z S, Wang W, *et al.* Characterization of CD3 γ / δ^+ cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103791.
- [28] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 100(1-2): 173-179.
- [29] Sareneva T, Pirhonen J, Cantell K, *et al.* Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon- γ [J]. *Biochemical Journal*, 1994, 303(3): 831-840.

Preparation and characterization of monoclonal antibodies for type II interferons in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

ZHU Xiaozhen, WANG Junya, JIA Zhao, WANG Zixuan, WANG Bangjie, ZOU Jun*

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Type II interferon, also termed IFN- γ (IFN- γ), is one of the key cytokines involved in the immune response of T helper 1 (Th1) lymphocytes. Fish and mammalian type II IFN- γ s are homologs, but unlike mammals which contain a single copy of IFN- γ gene, teleost fish have two duplicated copies, namely IFN- γ and IFN- γ related (IFN- γ rel) factor. To date, the expression and functions of fish IFN- γ s have been well documented, however fish IFN- γ rels have not been extensively investigated. For example, the cells producing IFN- γ and IFN- γ rel are unclear, whether they have differences in functions has also been debated. In this study, the IFN- γ and IFN- γ rel recombinant proteins of *Ctenopharyngodon idella* (*Ci*) were expressed in *E. coli* DE3 cells. The results showed that the *Ci*IFN- γ protein was soluble, while the *Ci*IFN- γ rel protein was insoluble. The recombinant IFN- γ and IFN- γ rel proteins were purified using affinity chromatography and size exclusion chromatography and used for preparation of monoclonal antibodies in mice. Four antibodies with high specificity and affinity were obtained after screening by Western blotting. It was revealed that the monoclonal *Ci*IFN- γ antibodies did not cross-react with the *Ci*IFN- γ rel protein and vice versa. Two of the antibodies were labeled with FITC fluorescein and could be used for immunofluorescent analysis and flow cytometry. Further, *C. idella* IFN- γ and IFN- γ rel monoclonal antibodies could not recognize their respective homologs from *Danio rerio*. To our knowledge, this is the first study reporting the preparation of IFN- γ rel monoclonal antibody in fish. The availability of *Ci*IFN- γ and *Ci*IFN- γ rel monoclonal antibodies will provide valuable information to investigate the cellular sources and biological functions of type II IFNs in *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; type II interferon; recombinant protein; monoclonal antibody; immunoassay

Corresponding author: ZOU Jun. E-mail: jzou@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32030112)