

红鳍东方鲀 IgM 重组表达及多克隆抗体制备

王森^{1,2,3} 黄宇希^{1,2,3} 彭欢^{1,2,3} 苏鹏⁴ 黎睿君^{1,2,3*}

¹大连海洋大学辽宁省海洋动物免疫学与疫病防控重点实验室,辽宁大连 116023;

²大连市海珍品疾病防控重点实验室,辽宁大连 116023;

³大连海洋大学水产与生命学院,辽宁大连 116023;

⁴大连富谷食品有限公司,辽宁庄河 116400)

摘要 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是我国重要的海水养殖经济鱼类,探究红鳍东方鲀 IgM 的结构与功能对其病害防治与免疫系统的研究均有重要意义。本研究克隆获取了红鳍东方鲀 IgM 的重(H)链恒定(C)区序列(大小为 1326 bp),并将获得的 IgM 序列连接至 pET28a 表达载体上,利用大肠杆菌 BL21 进行体外重组表达。SDS-PAGE 结果表明:重组蛋白红鳍东方鲀 IgM(TrIgM)大小约为 62 kDa,重组表达的 IgM 主要以包涵体形式表达。通过体外复性获得可溶性 TrIgM 蛋白,将制备的 TrIgM 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,获得了 TrIgM 鼠抗血清,Western Blot 检测结果表明:制备的鼠抗血清可以与重组 TrIgM 蛋白和红鳍东方鲀天然血清中的 IgM 重链蛋白特异性结合。本研究中制备的抗血清可作为检测红鳍东方鲀 IgM 的特异性抗体,为红鳍东方鲀相关免疫检测提供基础。

关键词 红鳍东方鲀;IgM;鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体

中图分类号 S931.5;S963 **文献标识码** A

文章编号 1007-5739(2022)10-0159-05

DOI:10.3969/j.issn.1007-5739.2022.10.044

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*),隶属于鲀形目(Tetraodontiformers)、鲀亚目(Tetraodontoidei)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*),俗称河鲀,主要分布于中国、日本、朝鲜及韩国等亚洲北部沿海地区^[1]。红鳍东方鲀肉质鲜美、营养丰富,享有“鱼中之王”的美誉,因其具有较高的经济价值,在我国河北、山东、辽宁大连等地均广泛养殖^[2]。近年来,红鳍东方鲀养殖规模逐渐扩大,已成为我国北方重要的海水经济养殖品种^[3]。然而,随着养殖规模的扩大,病害问题也日趋严重,制约其养殖业发展。关于红鳍东方鲀免疫系统及免疫机制的研究受到了人们越来越多的关注,以期通过免疫手段对病害进行预防。

免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)是由 B 淋巴细胞产生,在有颌脊椎动物的适应性免疫反应中起重要作用的一类免疫活性分子。一个典型的免疫球蛋

白分子由 2 条重(H)链和 2 条轻(L)链组成,每条链包含 1 个可变(V)区和 1 个或多个(在 H 链中)恒定(C)区。抗原结合通过 H 和 L 链 V 区所进行^[4]。根据 CH 区的化学结构差异可将 Ig 划为多种类型,目前在哺乳动物中已鉴定出 IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA 等 5 种亚型^[5],在硬骨鱼中已发现 IgM、IgD、IgT 和 IgZ^[6]等。其中,IgM 作为系统及个体发育中最早出现的免疫球蛋白,是鱼类特异性体液免疫应答中的最主要介质^[7],在抵抗病原入侵方面发挥着重要作用^[8]。

抗体具有特异性高、亲和力高、半衰期长以及毒性低等特点,是脊椎动物免疫学诊断及治疗的重要工具^[9]。硬骨鱼类抗体的功能与哺乳动物相似,具有调理吞噬细胞、激活补体途径、中和细菌和病毒等作用。抗体也可用来检测与纯化抗原,免疫印迹、免疫沉淀、免疫组织化学和免疫亲和层析等试验均需要抗体参与^[10]。本试验克隆并表达了红鳍东方鲀 IgM 的 CH 区片段,并利用重组表达的 IgM 蛋白制备鼠抗血清,以期红鳍东方鲀免疫系统、免疫机制研究及相关免疫检测提供基础。

基金项目 辽宁省科技厅自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0733);大连市高层次人才创新支持计划项目(2019RQ111);辽宁省教育厅面上项目(LJKZ0703)。

* 通信作者

收稿日期 2021-09-01

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用红鳍东方鲀来自辽宁省大连市富谷红鳍东方鲀养殖场,体长约20 cm;BALB/c小鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司。RNAiso Plus、反转录试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;克隆载体 pMD19 simple、表达载体 pET28a 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂均购自 Sigma 公司;Tris、Glycine、AP 标记的兔抗鼠 IgG 均购自 BBI 公司。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

取红鳍东方鲀成鱼脾脏,按照 RNAiso Plus 试剂盒操作说明提取红鳍东方鲀脾脏总 RNA,按照 Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 将提取的红鳍东方鲀脾脏总 RNA 反转录为 cDNA 第一链,于 -20 °C 保存。

1.3 红鳍东方鲀 IgM 重链基因克隆

根据 GenBank 中收录的红鳍东方鲀 IgM 基因序列(登录号:AB125609.1),利用 Primer Premier 5.0 设计用于 IgM CH 区(CH1~CH4)基因扩增的特异性引物,上游引物 TrIgM-F1 带有 *Sac* I 酶切识别位点:5'-CGAGCTCGCAACACCCAAAGCCCCTTCTCTG-3',下游引物 TrIgM-R1 带有 *Xho* I 酶切识别位点:5'-CCGCTCGAGCTTGGCCTTGCCTTGTCTCGGGGAT-3',扩增目的片段长度为 1 326 bp,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。利用特异性引物 TrIgM-F1 和 TrIgM-R1 扩增红鳍东方鲀 IgM H 链基因,将反应后的 PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化目的片段。回收后的片段与 pMD19 simple 载体连接,连接后的产物 pMD19-IgM 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,涂布于 LB 平板(含氨苄西林),置于 37 °C 恒温培养箱培养 12 h,挑取单菌落培养后进行菌液 PCR 鉴定并送样检测。

1.4 红鳍东方鲀 IgM 原核表达体系的构建

将鉴定正确的阳性单菌落扩培后经质粒提取试剂盒抽提质粒,用 *Xho* I 和 *Sac* I 双酶切处理 pMD19-IgM 与质粒 pET28a,双酶切产物切胶回收后使用 T4

连接酶 16 °C 连接过夜。连接获得重组质粒 pET28a-IgM 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于 LB 平板(含卡那霉素),置于 37 °C 恒温培养箱培养 12 h,挑取单菌落培养后进行菌液 PCR 鉴定并送样检测,检测正确的菌液扩培后提取质粒,将 pET28a-IgM 转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,涂布于 LB 平板(含卡那霉素),再于 37 °C 恒温培养箱培养 12 h,挑取单菌落培养后进行菌液 PCR 检测,检测正确菌液扩培后 -80 °C 保存。

1.5 红鳍东方鲀 IgM 重组蛋白表达与制备

将 BL21-pET28a-IgM 菌株接种到 LB 液体培养中(含卡那霉素),于 37 °C 条件下振荡培养至吸光度为 0.4 时加入 0.1 mol/L IPTG 诱导剂,在 37 °C 条件下诱导 1 h 后,于 4 °C 条件下以转速 12 000 r/min 离心 20 min。尽量去除培养上清液,用适量无菌 PBS 缓冲液重悬沉淀。于 4 °C 条件下以转速 12 000 r/min 离心 20 min,洗涤 1 次后置于超声波破碎装置中,在冰浴条件下进行超声波破碎。以 255 Hz 超声波处理 5 s,暂停 5 s,溶液至澄清后停止破碎。然后,于 4 °C 条件下以转速 12 000 r/min 离心 20 min。分别收集上清液与沉淀,沉淀用与上清液相同体积的无菌 PBS 重悬。采用 12% SDS-PAGE 电泳分析上清液、沉淀与菌体中重组蛋白的表达情况。

将收集的重组蛋白沉淀依次使用浓度为 0、2、4、6 mol/L 尿素溶液于 4 °C 以转速 12 000 r/min 离心 20 min 洗涤,并用 8 mol/L 尿素溶液溶解过夜。于 4 °C 以转速 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液进行透析复性。透析液中尿素浓度依次为 4.5、3.5、2.5、1.5、0.5、0 mol/L 等 8 个梯度,每隔 8 h 更换 1 次透析液。复性后重组蛋白进行 SDS-PAGE 检测,于 -80 °C 保存。

1.6 鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体的制备

选 6 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,采用腹腔注射方式进行免疫。将红鳍东方鲀 IgM 重组蛋白在冰上解冻,与等体积的弗氏佐剂充分乳化,制成疫苗。首次免疫使用弗式完全佐剂,免疫剂量 100 μ L/只。首免 2 周后进行第 2 次免疫,加强免疫使用弗式不完全佐剂,免疫剂量为 100 μ L/只。取 IgM 重组蛋白 50 μ g 与弗氏完全佐剂等量混合乳化,于小鼠腹腔进

行注射。7 d 后进行第 3 次免疫,第 3 次免疫 7 d 后采用心脏取血方法,分离纯化多抗血清。同时设立对照组,对照组不进行注射,与免疫组同时取血并分离纯化血清。

1.7 鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体 Western Blot 分析

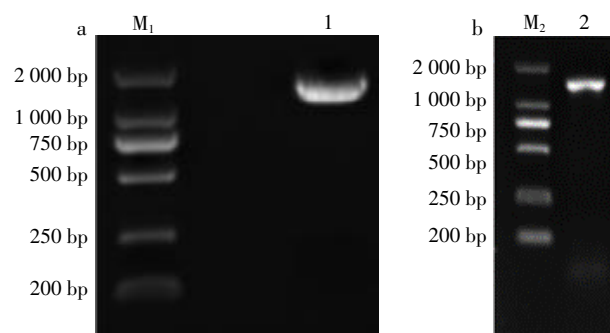
通过尾部取血方法收集红鳍东方鲀成鱼血清,将重组蛋白与天然红鳍东方鲀血清进行 SDS-PAGE 电泳与 Western Blot 分析。Western Blot 同时设立试验组与对照组,待 SDS-PAGE 电泳结束后,用 PVDF 膜(需提前使用甲醇浸泡)小心覆盖住胶体并驱赶气泡,滤纸及夹板夹紧置于转膜仪中,恒流 180 mA,转膜 50 min。转膜结束后,小心取出 PVDF 膜,将膜浸入 5% 的脱脂奶粉溶液中,室温封闭 2 h;弃去脱脂奶粉溶液,使用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min;试验组加入 PBS 缓冲液按 1:1 000 比例稀释的鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体作为一抗,对照组使用按 1:1 000 比例稀释的未注射组小鼠血清,于 4 ℃ 孵育过夜;使用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min;加入 PBS 缓冲液按 1:3 000 比例稀释的 AP 标记兔抗鼠二抗,室温孵育 1 h;使用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min;根据膜的大小加入适当体积的 NBT/BCIP 显色试剂,避光室温孵育至显色,将膜置于去离子水中,终止显色反应并观察试验结果。

2 结果与分析

2.1 红鳍东方鲀 IgM 重链基因克隆与原核表达体系的构建

根据红鳍东方鲀 IgM CH 区(CH1~CH4)基因设计特异性引物 TrIgM-F1 和 TrIgM-R1,对提取的红鳍东方鲀 cDNA 进行 PCR 扩增并切胶回收,扩增条带大小为 1 300 bp 左右,与目的基因(1 326 bp)大小相符,见图 1(a)。将回收后片段与 pMD19 simple 载体连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中培养。挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定并送样检测,检测正确后提取质粒。使用 *Xho* I 和 *Sac* I 双酶切处理 pMD19-IgM 与质粒 pET28a,将目的基因插入表达载体 pET-28a,并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中培养。挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定并送样检测,检测正确

后提取质粒。将 pET28a-IgM 转化至表达菌株 BL21 中,挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定,扩增条带大小为 1 300 bp 左右,与目的基因大小相符,见图 2(b)。这表明 BL21-pET28a-IgM 表达体系构建完成。

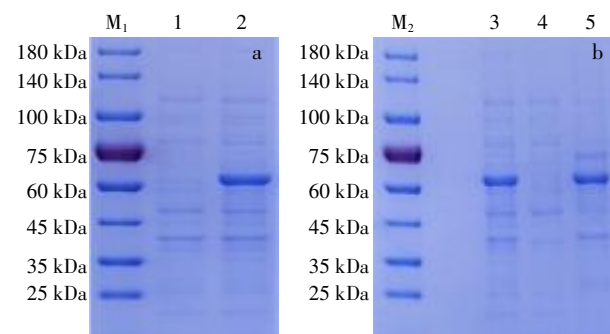


注:a 为 PCR 扩增,b 为阳性克隆 PCR 鉴定。M₁、M₂ 为 DL2000 DNA Marker;1 为红鳍东方鲀 IgM 重链恒定区 CH1~CH4 基因 PCR 扩增条带;2 为 BL21-pET28a-IgM 阳性克隆 PCR 扩增条带。

图 1 红鳍东方鲀 IgM H 链恒定区 CH1~CH4 基因扩增及 BL21-pET28a-IgM 表达体系 PCR 鉴定

2.2 红鳍东方鲀 IgM 重组蛋白诱导表达与鉴定

选取加入 0.1 mol/L IPTG 诱导的目的蛋白表达菌株 BL21-pET28a-IgM,利用超声波破碎后离心,将 pET28a 空载体菌与诱导后的 BL21-pET28a-IgM 表达菌进行 SDS-PAGE 电泳,见图 2(a)。结果表明,诱导后的表达菌有目的蛋白表达,蛋白分子量为 62 kDa 左右,与预期相符合。取表达菌总蛋白、破碎后上清和无菌 PBS 重悬沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,见图 2(b),目的蛋白只存在于沉淀中,说明 IgM 以包涵体形式表达。



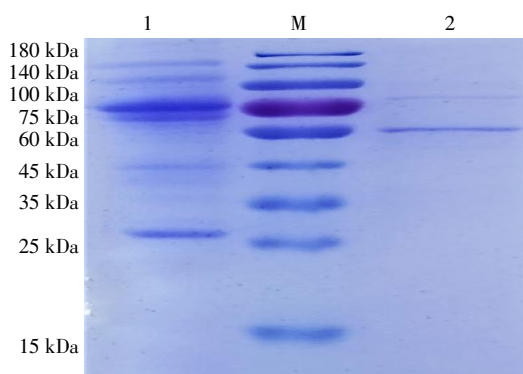
注:a 为诱导表达,b 为可溶性分析。M₁、M₂ 为 PageRuler 预染蛋白 Marker;1 为 pET28a 空载体菌;2、3 为 BL21-pET28a-IgM 表达菌,4 为破碎后 BL21-pET28a-IgM 表达菌上清;5 为破碎后重悬 BL21-pET28a-IgM 表达菌沉淀。

图 2 pET28a-IgM 重组蛋白诱导表达

2.3 鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体 Western Blot 分析

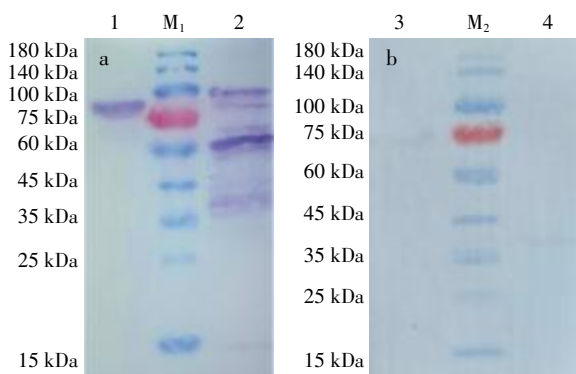
将复性后重组蛋白与天然红鳍东方鲀血清进行

SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 分析。SDS-PAGE 结果表明,天然红鳍东方鲀血清中 76 kDa 处有明显蛋白条带,为红鳍东方鲀分泌型 IgM(sIgM)蛋白(图 3)。Western Blot 结果显示,试验组鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体可以特异性识别天然红鳍东方鲀血清 76 kDa 处蛋白,见图 4(a),同时可以特异性识别 62 kDa 处重组蛋白且显色过程迅速(1 min);对照组血清未出现条带,见图 4(b),表明鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体不仅可以特异性识别 IgM 重组蛋白,而且可以特异性识别天然红鳍东方鲀血清中的 IgM 蛋白。以上结果与预期相符合,说明鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体已成功制备。



注: M 为 PageRuler 预染蛋白 Marker; 1 为天然红鳍东方鲀血清; 2 为重组蛋白 pET28a-IgM。

图 3 天然红鳍东方鲀血清与重组蛋白 SDS-PAGE



注: M₁、M₂ 为 PageRuler 预染蛋白 Marker; 1 为试验组天然红鳍东方鲀血清; 2 为试验组重组蛋白 pET28a-IgM; 3 为对照组天然红鳍东方鲀血清; 4 为对照组重组蛋白 pET28a-IgM。

图 4 天然红鳍东方鲀血清与重组蛋白 Western Blot 分析

3 结论与讨论

本研究根据 NCBI 红鳍东方鲀 IgM H 链序列,成功克隆红鳍东方鲀 IgM 的 CH 区(CH1~CH4)1 326 bp 基因。红鳍东方鲀 IgM H 链全长约为 3 500 bp,其中 sIgM 约为 1 900 bp,包含一个 VH 区和 CH1~CH4 这

4 个恒定区。其中每个 VH 结构域可分为 3 个高度可变序列的互补决定区(CDR)和 4 个相对恒定序列的框架区(FR)。VH 结构域的多样性主要由 3 个 CDR 区域决定,CDR 区域序列具有高变性,有利于识别不同种抗原,刺激机体产生免疫反应,进而增强对环境的适应性。IG 亚型则可以基于 CH 区的性质来定义^[11],与哺乳动物 sIgM 五聚体的结构不同,鱼类 sIgM 在 CH4 结构域下游缺少一个额外的结构域,是由 2 条 L 链和 2 条 H 链所组成的单体通过连接链“J”将 4 个单体连接而成,为四聚体结构^[12]。

IgM 作为硬骨鱼类体内含量最多的免疫球蛋白,目前研究认为其主要分布于鱼类的肾脏、胸腺及脾脏器官中,而随着鱼类个体的生长,胸腺逐渐退化,其在免疫中发挥的功能也逐渐减小^[13]。Saha 等^[14]研究发现红鳍东方鲀中头肾、中肾与脾脏中 IgM 的表达量远高于其他组织,而胸腺中 IgM 的表达量与其他组织并无显著性差异,表明成年红鳍东方鲀的胸腺在机体免疫中的作用可能并不如脾脏与头肾重要。对草鱼^[15]、金鱼^[16]等鱼类的研究也证明鱼类的肾脏与脾脏在鱼类的免疫应答中发挥重要作用。对红鳍东方鲀早期发育时期的 sIgM mRNA 进行检测,发现其在孵化后 1 d 已经产生表达,表明红鳍东方鲀可能在早期就可以识别抗原并产生相关免疫应答^[14]。当细菌、寄生或者病毒刺激鱼体时,研究鱼体内的 IgM 的变化规律有助于病害的防治工作。Tsutsui 等^[17]通过亲和层析法与离子交换层析法从天然红鳍东方鲀血清中分离得到 IgM 蛋白,发现其对海水鱼类常见的革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌以及大肠杆菌的生长都有显著的抑制作用,表明 IgM 分子在抵抗鱼类细菌性疾病中发挥重要作用;在抵抗寄生虫疾病方面,红鳍东方鲀皮肤和鳃的黏膜中分泌的 IgM 分子同样被证实可以与单殖吸虫的纤毛表皮细胞结合,进而识别并抵抗寄生虫寄生^[18]。

为研究红鳍东方鲀患病前后 IgM 表达量的变化规律,本研究将合成的 IgM 基因片段克隆到 pET28a 载体上进行原核表达。结果表明,pET28a-IgM 蛋白大部分以包涵体的形式存在,通过尿素使蛋白变性后透析复性得到可溶蛋白 TrIgM。本研究以 TrIgM 蛋

白作为抗原制备了鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体,为了检测制备的抗血清的结合特异性,分别与 TrIgM 蛋白、天然红鳍东方鲀血清进行了 Western Blot 检测。有研究表明,红鳍东方鲀的 IgM H 链约为 76 kDa^[9],与本试验中 Western Blot 检测的红鳍东方鲀 IgM 的大小相符,说明所制备的 TrIgM 鼠抗血清可以与天然红鳍东方鲀血清中的 IgM 特异性结合。因此,本试验中所制备的 TrIgM 鼠抗血清可以用于检测红鳍东方鲀 IgM 在不同条件下表达量。

综上所述,本研究成功合成了红鳍东方鲀 IgM CH 区基因片段,表达了 TrIgM H 链蛋白并成功制备了鼠抗红鳍东方鲀 IgM 多克隆抗体,为进一步研究红鳍东方鲀 IgM 在不同条件下的表达规律和免疫机制奠定了基础。

4 参考文献

- [1] 马爱军,李伟业,王新安,等.红鳍东方鲀养殖技术研究现状及展望[J].海洋科学,2014,38(2):116-121.
- [2] 苟盼盼,王秀利,窦冬雨,等.红鳍东方鲀不同家系群体的形态性状差异与相关性分析[J].大连海洋大学学报,2019,34(5):674-679.
- [3] 高露姣,黄艳青,夏连军,等.不同养殖模式下红鳍东方鲀的品质比较[J].水产学报,2011,35(11):1668-1676.
- [4] SCHROEDER H W, CAVACINI L. Structure and function of immunoglobulins[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125(2): S41-S52.
- [5] FLAJNIK M F, KASAHARA M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(1): 47.
- [6] ZHU L Y, NIE L, ZHU G, et al. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 39(1/2): 39-62.
- [7] 王荻,刘红柏.5种鲟鱼免疫球蛋白重链恒定区序列研究[J].遗传,2006,28(10):1247-1253.
- [8] 叶仕根,费阳春,李强,等.黄颡鱼免疫球蛋白 M 基因的克隆与组织表达分析[J].大连海洋大学学报,2013,28(6):515-521.
- [9] 曹志伟,陈红英.鲫和虹鳟 IgM 重链恒定区的融合表达及抗血清的制备[J].水产学杂志,2019,32(4):9-14.
- [10] TRIER N H, HANSEN P R, HOUEN G. Production and characterization of peptide antibodies[J]. Methods, 2012, 56(2): 136-144.
- [11] FLAJNIK M F. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents[J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2(9): 688-698.
- [12] 赵景壮,徐黎明,刘森,等.虹鳟 IgM 重链恒定区的表达及兔抗血清的制备[J].水产学报,2014,38(8):1175-1181.
- [13] 刘卫刚,韩坤煌,谢芳靖,等.大黄鱼免疫球蛋白 M 重链基因全长 cDNA 序列的克隆与表达[J].集美大学学报(自然科学版),2018,23(6):407-415.
- [14] SAHA N R, SUETAKE H, SUZUKI Y. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes*[J]. Molecular Immunology, 2005, 42(1): 113-124.
- [15] 王欣欣,孙宝剑,昌鸣先,等.草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达[J].水产学报,2008,32(1):13-20.
- [16] NEUMANN N F, STAFFORD J L, BELOSEVIC M. Biochemical and functional characterisation of macrophage stimulating factors secreted by mitogen-induced goldfish kidney leucocytes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(2): 167-186.
- [17] TSUTSUI S, ARIJI T, SATO A, et al. Serum GlcNAc-binding IgM of fugu (*Takifugu rubripes*) suppresses the growth of fish pathogenic bacteria: a novel function of teleost antibody[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(1): 20-26.
- [18] IGARASHI K, MATSUNAGA R, HIRAKAWA S, et al. Mucosal IgM antibody with d-mannose affinity in fugu *Takifugu rubripes* is utilized by a monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi* for host recognition[J]. Journal of Immunology, 2017, 198(10): 4107-4114.
- [19] MIYADAI T, OOTANI M, TAHARA D, et al. Monoclonal antibodies recognising serum immunoglobulins and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(3): 211-222.