

尼罗罗非鱼 PKC θ 蛋白和 Spartin 蛋白的原核表达、抗体制备及其组织表达

潘传燕 冯鹏霏 张永德 杨慧赞 张彬 陈福艳
陆专灵 杜雪松 童桂香 罗洪林*

广西水产科学研究院/广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室 南宁 530021

摘要: 为了研究尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 蛋白激酶 C theta (PKC θ) 和 Spartin 的蛋白表达情况, 本实验在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达和提纯了尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 的重组蛋白, 并利用日本大耳兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 制备了相应的多克隆抗体。用间接 ELISA 技术检测抗体效价, Western Blot 鉴定抗体的特异性, 并检测其在罗非鱼肝、脾、肠和肌肉组织中的表达情况。结果表明, 实验成功构建了原核表达载体 pET-B2m-PKC θ 和 pET-B2m-Spartin, 实现了重组蛋白的原核表达和纯化。PKC θ 重组蛋白主要存在于包涵体中, 分子量约为 56 ku; Spartin 重组蛋白分子量约为 30 ku, 以包涵体蛋白的形式存在。获得的多克隆抗体效价均高达 1 : 512 000, Western Blot 检测结果表明, 制备的抗体能特异性识别尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 多种异构体; PKC θ 蛋白在罗非鱼肝、脾、肠与肌肉组织中均有表达; Spartin 蛋白在罗非鱼的肝、脾和肠组织中不表达, 在肌肉组织中表达。研究表明, 尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 重组蛋白在大肠杆菌中成功表达, 获得了高效价的多克隆抗体, 并明确了尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 在不同组织中的表达情况, 为进一步研究尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 的功能及其作用机制奠定了基础。

关键词: 尼罗罗非鱼; PKC θ ; Spartin; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 05-637-10

Prokaryotic Expression, Antibody Preparation and Tissue Expression Analysis of PKC θ and Spartin in Nile Tilapia

PAN Chuan-Yan FENG Peng-Fei ZHANG Yong-De YANG Hui-Zan ZHANG Bin
CHEN Fu-Yan LU Zhuan-Ling DU Xue-Song TONG Gui-Xiang LUO Hong-Lin*

Guangxi Academy of Fishery Sciences/Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Nanning 530021, China

Abstract: In order to study the expression of PKC θ and Spartin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), these two proteins were expressed in *Escherichia coli*, purified, and then used to immunize Japanese big-ear white

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31372553, 31760765);

* 通讯作者, E-mail: 541365548@qq.com;

第一作者介绍 潘传燕, 女, 工程师; 研究方向: 水生动物遗传育种; E-mail: 723870955@qq.com。

收稿日期: 2020-03-15, 修回日期: 2020-07-24 DOI: 10.13859/j.cjz.202005012

rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) according to the conventional method to prepare rabbit anti-PKC θ and rabbit anti-Spartin polyclonal antibody. The titers of rabbit anti-PKC θ and rabbit anti-Spartin antiserum were evaluated by indirect ELISA. The expressions of these two proteins in different tissues (liver, spleen, intestine and muscle) of Nile tilapia were detected by Western Blotting. The results showed that the prokaryotic expression vectors of pET-B2m-PKC θ and pET-B2m-Spartin were successfully constructed, the recombinant PKC θ and Spartin proteins were expressed in inclusion body with molecular weight of 56 ku and 30 ku, respectively. The indirect ELISA assay showed that the rabbit anti-PKC θ and rabbit anti-Spartin antisera had a good sensitivity with the titer of 1 : 512 000, and Western blotting showed that the polyclonal antibody had good specificity. PKC θ protein was expressed in the liver, spleen, intestine and muscle. Spartin protein was only expressed in the muscle. In this study, the PKC θ and Spartin recombinant proteins of Nile tilapia were expressed and purified successfully, the polyclonal antibodies against PKC θ and Spartin proteins with a high titer were obtained, and the expressions of PKC θ and Spartin in different tissues of Nile Tilapia were determined. The current study will shed new light on the functional and mechanism study on PKC θ and Spartin in Nile tilapia.

Key words: Nile Tilapia; PKC θ ; Spartin; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 具有生长快、食性杂、耐低氧、个体大、产量高和肥满度高等多种优良的养殖性状, 受到世界各国养殖户和消费者的青睐, 是我国主要的淡水养殖品种之一。近年来, 病害频发困扰着整个水产养殖业, 并阻碍了水产养殖业的进一步发展。已有研究发现 Spartin 参与多种细胞过程, 在氧化应激反应中具有保护作用 (Truong et al. 2015), 并与人类多种癌症的发生发展有关。蛋白激酶 C theta (protein kinase C θ , PKC θ) 在肿瘤和免疫性疾病中发挥重要作用, PKC θ 可以促进一种有效的促炎 CAM 表型, 在细菌感染过程中 CAM 分化开始时 TLR4/MyD88 信号传导和选择性抑制抗炎细胞因子 IL-10 之间起重要作用, 从而增强保护性抗菌免疫 (Pfeifhofer-Obermair et al. 2016)。Spartin 蛋白参与多种细胞过程, 且可以和多种受体结合。研究鱼类 PKC θ 和 Spartin 的功能及其作用机制, 有助于开展鱼类免疫及相关疾病的研究。因此, 研究尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 的原核表达, 多克隆抗体制备及其组织分布, 对进一步研究这两个基因的功能具有重要意义。

蛋白激酶 C- θ (PKC θ) 是丝氨酸/苏氨酸激

酶蛋白激酶 C (PKC) 家族中的新型 PKC 亚型成员之一, 是一种钙离子非依赖性蛋白激酶, 它依赖二酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 等脂质激活。PKC θ 主要分布于骨骼肌和造血系统中, 参与胞内信号转导, 调控 T 细胞的活化和存活, 与肿瘤的发生和发展有密切联系。PKC θ 在 T 细胞分裂、增殖和细胞因子产生过程中起重要作用, 改变多种基因的转录水平。已有研究表明, GnRH 通过 PKC 激活硬骨鱼罗非鱼中的 MAPK 级联 (Gur et al. 2001)。目前关于 PKC θ 的研究对象主要是人类, 张广超等 (2010) 认为 PKC θ 可作为评价脑膜瘤侵袭程度的指标之一。Harper 等 (2010) 证实 PKC θ 在血小板激活、聚集、释放过程中起着关键作用。PKC θ 可通过 NF- κ B 途径激活潜伏的 HIV (Jiang et al. 2015)。PKC θ 在鱼类中的研究尚未见报道。

Spartin 蛋白由 666 个氨基酸残基组成, 广泛分布于人体内, 由 *spg20* 基因编码, 在神经系统和非神经元组织中普遍表达 (Lu et al. 2006)。Spartin 蛋白位于几个不同的细胞器, 包括核内体、线粒体等 (李立彬 2015)。Spartin 蛋白是一种多功能蛋白, 由三个保守结构域组成, 即微管相互作用和运输结构域、泛素结合

域以及植物相关的衰老结构域 (Cicarelli et al. 2003, Karlsson et al. 2014)。已经发现 Spartin 与细胞内的表皮生长因子、受体转运等生物过程相关, Spartin 蛋白与多种细胞器相关, 且具有和多种受体结合的能力 (Robay et al. 2006, Edwards et al. 2009, Geisler et al. 2010)。过度表达的和内生 Spartin 蛋白均被证实与核内体、脂肪滴和线粒体相关。与分布在多种细胞器中一样, Spartin 蛋白涉及多种细胞过程。Renvoisé 等 (2012) 研究发现, Spartin 可减少细胞凋亡和坏死。Spartin 蛋白被证明具有抑制 BMP 信号通路和其他 HSP 蛋白质共享的功能 (Alberts et al. 2010)。Spartin 蛋白与遗传性痉挛性截瘫、食管腺癌、结直肠癌的发生发展有关。另有学者发现 Spartin 蛋白与表皮生长因子受体的降解有关, 该受体的运输和胞吞作用会受到基因突变的影响 (Bakowska et al. 2007)。目前尚未见尼罗罗非鱼 Spartin 的相关报道。

为进一步了解 PKC θ 和 Spartin 在尼罗罗非鱼中的作用及其机制, 本研究通过构建尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 原核表达载体, 利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 原核表达系统表达 PKC θ 和 Spartin 重组蛋白, 分析重组蛋白的表达情况, 并将纯化后的重组蛋白免疫日本大耳兔 (*Oryctolagus cuniculus*), 制备多克隆抗体, 为进一步研究尼罗罗非 PKC θ 和 Spartin 的功能及其作用机制奠定基础。

1 材料与方法

尼罗罗非鱼采自国家级广西南宁罗非鱼良种场, 体重 327.6 g/尾; 总 RNA 的提取、cDNA 和质粒的制备在广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室完成。

1.1 PKC θ 和 Spartin 基因扩增及原核表达质粒构建

根据大肠杆菌密码子的偏好性, 将尼罗罗非鱼 PKC θ 基因 (NCBI No. XP_005475922.1) 与 Spartin 基因异构体 X1 序列 (NCBI No. XP_029373409.1) 翻译成核酸序列, 根据核酸

序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 (表 1), 引物 5'端添加一段载体同源性序列, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增条件如下: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 45 s, 28 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 之后用 DNA 回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 进行切胶回收。

表 1 PKC θ 和 Spartin 引物序列

Table 1 Primer sequences of PKC θ and Spartin

引物名称	Primer code	引物序列	Primer sequence (5' - 3')
PKC θ -F		TCCACTGGGTCTCTCGGACTATGAG	CCGTTTCTG
PKC θ -R		TAAGGCCGCACTCGAGCACCACA	CCCAGATTTATGC
Spartin-F		TCCACTGGGTCTCTCGGACTATGTA	TGTTGGTGTGT
Spartin-R		TAAGGCCGCACTCGAGCACCACCT	TAACCATTGCAACT

采用无缝克隆技术, 分别将 PKC θ 与 Spartin 基因 PCR 产物克隆至原核表达载体 pET-B2m (武汉金开瑞生物工程有限公司), 构建重组表达质粒。转至大肠杆菌 B21 (武汉金开瑞生物工程有限公司) 中培养, 挑选阳性克隆, 由上海生工生物工程技术有限公司完成测序鉴定。

1.2 重组蛋白的表达和纯化

分别将重组质粒 (pET-B2m-PKC θ 、pET-B2m-Spartin) 转化至大肠杆菌 B21 中, 在 LB 培养基上进行扩大培养, 培养基已提前加入 10⁵ g/L 的氨苄青霉素 (ampicillin, Amp⁺), 培养温度为 37 °C, 当 A_{600 nm} 为 0.6 后, 将培养温度降为 30 °C, 此时加入异丙基- β -D 硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) (Merck), IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L, 30 °C 条件下诱导培养 180 min。然后收集菌液, 离心收集菌体并用超声破碎, 4 °C 20 000 g 离心 0.5 h, 收集上清液和沉淀, 然后进行 SDS-PAGE 分析。

利用 Ni-NTA 树脂层析柱纯化重组蛋白,

收集菌体, 用 10 倍柱床体积的 NTA Buffer 冲洗, 流速控制在 1 ml/min 左右, 收集洗脱液。用紫外吸收法检测纯化后的蛋白浓度, 并用 SDS-PAGE 电泳检测纯化后的重组蛋白。

1.3 蛋白结构分析和抗原预测

用 ExPASy 中的 ProtScale 模块 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析 PKC θ 和 Spartin 蛋白质的疏水性, 蛋白序列的跨膜区间用 TMHMM server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行预测, 使用 DNASTar 软件的 Protean 模块预测蛋白的亲水性、抗原指数等参数。

1.4 多克隆抗体制备和效价检测

用日本大耳兔 4 只 (PKC θ 试验兔编号为 G455、G456; spartin 试验兔编号为 G459、G460), 耳静脉采集免疫前血清作为阴性对照。将纯化后的重组蛋白与弗氏完全佐剂 (Sigma) 按 1:1 的体积比均匀混合, 在日本大耳兔皮下多点注射, 注射剂量为 500 μ g/只。每只兔最少免疫 4 次, 包括初次免疫和 3 次加强免疫 (加入弗氏不完全佐剂), 每次免疫间隔 2 周。每次免疫 1 周后耳静脉采血, 血液在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜, 分离血清, 用间接 ELISA 法检测抗体的效价。

重组蛋白在 96 孔板中完成抗原包被, 蛋白浓度为 2 mg/L, 加样量为 100 μ l/孔, 置于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 以免疫前血清作阴性对照, 待检样品按 1:2000、1:4000 作梯度稀释至 1:32768000, 将稀释液作为一抗加入到 96 孔板中; 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗。用 TMB 显色液进行显色反应, 显色液用量为 100 μ l/孔, 显色时间为 20 min, 加入 50 μ l H₂SO₄ 终止显色反应。用酶标仪检测 A_{450 nm} 值, 产生阳性反应的最大稀释度即为抗体的效价。

1.5 抗体特异性的 Western Blot 分析

以免疫前血清为对照, 取 25 ng 和 10 ng 纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 之后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF 膜) (ThermoFisher) 上, 放置 1 h 后用

PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 于封闭液 (1%酪蛋白) 中 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。以制备的兔抗血清 1:1000 倍稀释液为一抗, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; 洗涤后再用 HRP 标记的羊抗兔 IgG (Jackson) 作为二抗检测多克隆抗体的特异性。分别取罗非鱼肝、脾、肠与肌肉, 提取蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 以验证制备的多克隆抗体与罗非鱼组织总蛋白中相应蛋白的特异性结合能力。

1.6 抗体纯化

采用 Protein G 亲和层析柱 (GE healthcare) 对获得的多克隆抗体进行纯化, 详细操作步骤见张永德等 (2018) 的方法。将抗血清与 2 \times PBS 缓冲液按 1:1 混合, 经 10 倍柱体积以上的 PBS 洗涤, 直至流出液无蛋白检出, 加入 2 倍柱体积 0.1 mol/L 柠檬酸 (pH 2.7) 洗脱, 收集洗脱产物, SDS-PAGE 电泳检测纯化后的多抗。

2 结果

2.1 原核表达质粒的构建与鉴定结果

根据抗原性分析结果, 将尼罗罗非鱼 PKC θ 蛋白 1~400 aa 和 Spartin 蛋白 310~428 aa 对应的碱基序列克隆至原核表达载体 pET-B2m 中, 构建了原核表达载体 pET-B2m-PKC θ 和 pET-B2m-Spartin。将重组表达质粒转化至大肠杆菌 B21 培养后挑斑鉴定, 经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, PKC θ 目的条带大小为 1200 bp (图 1a), Spartin 目

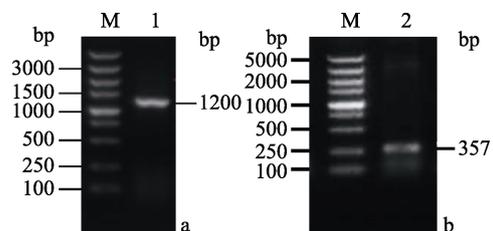


图 1 *PKC θ* (a) 和 *Spartin* (b) 基因扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of genes encoding *PKC θ* (a) and *Spartin* (b)

M. DL2000; 1. *PKC θ* ; 2. *Spartin*

的条带大小为 357 bp (图 1b), 均与预期大小一致。测序结果显示, 目标序列 100% 正确, 证实以上两个基因均已正确插入载体 pET-B2m 中, 表达载体构建成功。

2.2 重组蛋白的表达与纯化

通过诱导剂 (异丙基- β -D 硫代半乳糖苷, IPTG) 对重组蛋白进行诱导表达, 当诱导剂 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 30 °C 诱导 3 h, PKC θ 和 Spartin 均得到较高水平的表达 (图 2)。PKC θ 重组蛋白的上清液与沉淀均在 56 ku 处出现 1 条蛋白条带, 而未诱导菌株在 56 ku 处未检测到明显的蛋白条带; Spartin 重组蛋白的上清液与沉淀均在 30 ku 处出现 1 条蛋白条带, 未诱导菌株在 30 ku 处未检测到明显的蛋白条带。PKC θ 与 Spartin 诱导菌株沉淀中蛋白的含量均显著高于上清液中, 表明 2 种重组蛋白均主要以包涵体的形式表达。

PKC θ 和 Spartin 的重组蛋白经纯化后, SDS-PAGE 电泳结果显示分别在 56 ku、30 ku 处有一条清晰的蛋白条带 (图 3), 纯化后的 PKC θ 蛋白纯度达 85%, 质量浓度达 3 g/L; 纯化后的 Spartin 蛋白纯度达到 90%, 质量浓度为 2 g/L; 均是适合免疫日本大耳兔的抗原。

2.3 跨膜区和抗原性分析

PKC θ 和 Spartin 蛋白的跨膜区、表面可及

性、亲疏水性等参数的分析结果见图 4。PKC θ 编码 720 个氨基酸, 无跨膜区, 无信号肽序列。PKC θ 平均疏水性为 -0.454, 序列中含有较多的亲水性氨基酸, 序列亲水性较好。亲水性区段主要为: 35~69、93~104、108~118、120~157、187~203、224~252、263~284、302~318、345~366、376~390、412~418、538~550、591~618、628~663、669~691 (图 4a)。PKC θ 蛋白全长序列中具有较为丰富且分布均匀的潜在抗原表位位点。其中抗原指数较高的区段为: 35~52、121~144、189~199、215~234、242~255、301~323、356~375、423~445、509~520、537~552、590~613、627~645、648~660、667~695 (图 4a)。由于蛋白过长, 考虑到蛋白表达的成功率, 选取 1~400 aa 进行表达。

Spartin 蛋白的二级结构、B 细胞表位、跨膜序列、疏水性等参数分析结果见图 4b。Spartin 编码 642 个氨基酸, 1 次跨膜, 279~298 aa 为跨膜区, 无信号肽序列, 局部亲水性好, 429~614 aa 为超家族, 选取 310~428 aa 表达蛋白进行多抗免疫, 该段抗原指数得分适中, 可以引起较好的免疫效果。

2.4 多克隆抗体的效价检测

以免疫前血清作为阴性对照, 免疫一周后,

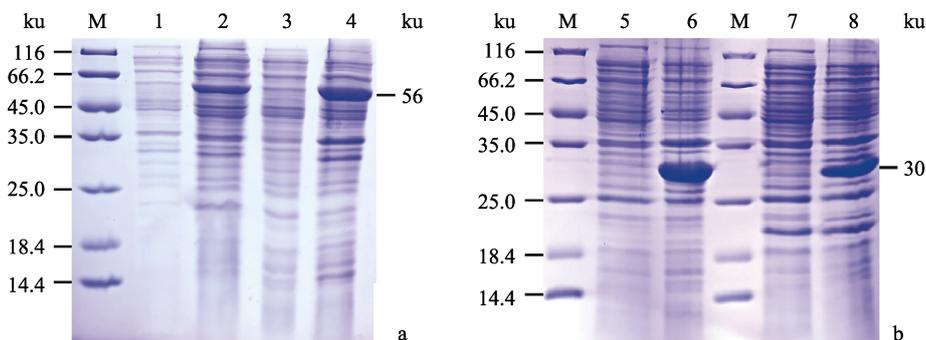


图 2 重组 PKC θ (a) 和 Spartin (b) 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 The electrophoresis of recombinant PKC θ (a) and Spartin (b) proteins analyzed by SDS-PAGE

M. 蛋白质 Marker; 1, 5. 未诱导重组表达菌; 2, 6. 诱导后的重组表达菌; 3, 7. 诱导表达菌的上清; 4, 8. 诱导表达菌的沉淀

M. Standard protein marker; 1, 5. No induced host bacteria; 2, 6. Host bacteria induced by IPTG; 3, 7. Supernatant of host bacteria induced by IPTG; 4, 8. Precipitate of host bacteria induced by IPTG

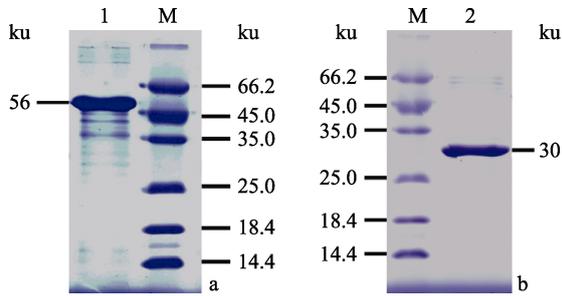


图3 纯化后的重组 PKCθ 蛋白 (a) 和重组 Spartin 蛋白 (b)

Fig. 3 Purified PKCθ recombinant protein (a) and Spartin recombinant protein (b)

M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化后的重组 PKCθ 蛋白; 2. 纯化后的重组 Spartin 蛋白

M. Standard protein Marker; 1. Purified PKCθ recombinant protein; 2. Purified Spartin recombinant protein

耳静脉采血并分离血清, 用间接 ELISA 法检测多抗的效价。制备的 PKCθ 与 Spartin 多克隆抗体的效价均为 1 : 512 000 (图 5)。抗体效价高, 说明该重组蛋白能诱导日本大耳兔产生良好的

免疫反应。

2.5 抗体特异性检测结果

利用蛋白质印迹法检测抗体的特异性, SDS-PAGE 分别在 56 ku、30 ku 处检测到清晰条带, 且无杂带 (图 6)。25 ng 重组蛋白的蛋白条带较 10 ng 的蛋白条带粗, 而阴性对照无特异性条带, 多克隆抗体能特异性地结合尼罗罗非鱼 PKCθ 和 Spartin 表达蛋白。此外, 验证了多克隆抗体与罗非鱼肝、脾、肠与肌肉总蛋白中相应蛋白的特异性结合能力 (图 7)。PKCθ 多克隆抗体在罗非鱼的肝、脾、肠与肌肉组织中均有表达 (图 7a)。Spartin 多克隆抗体在罗非鱼的肝、脾和肠组织中不表达, 在肌肉组织中表达 (图 7b)。

2.6 抗体纯化结果

收集的 PKCθ 和 Spartin 抗血清经纯化后, 纯度均达到 85% 以上, 质量浓度分别为 3 g/L、10 g/L。SDS-PAGE 分析结果显示, 在约 50 ku 和 25 ku 处有清晰的条带 (图 8), 表明抗体纯化效果良好。

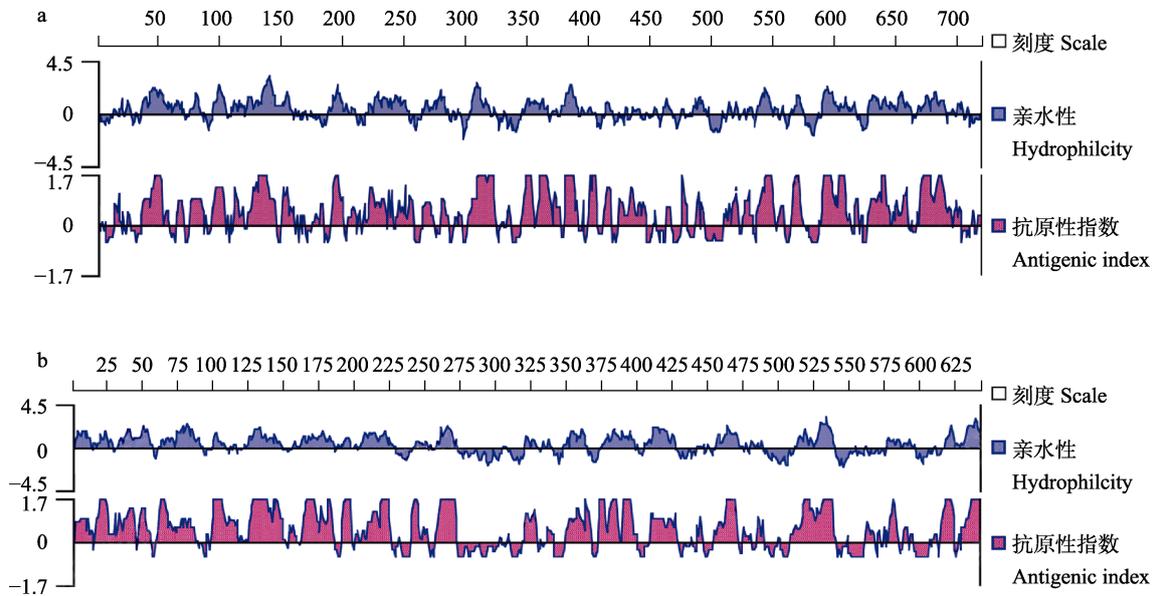


图4 尼罗罗非鱼 PKCθ (a)、Spartin (b) 蛋白的亲水性和抗原性分析

Fig. 4 Hydrophilicity and antigenicity analysis of PKCθ (a) and Spartin (b) proteins in Nile tilapia.

图中刻度为氨基酸排列位置。The scales indicate the positions of amino acids.

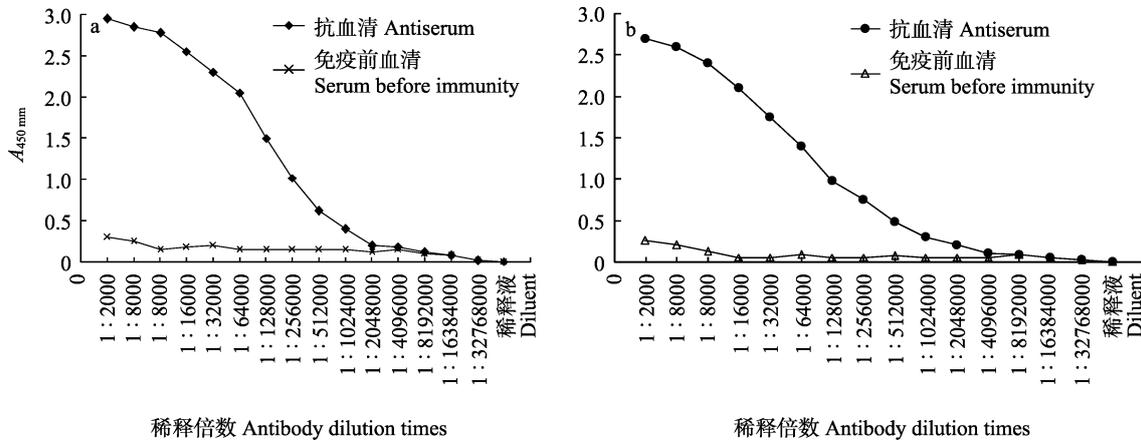


图 5 PKC θ (a) 和 Spartin (b) 多克隆抗体效价的 ELISA 曲线

Fig. 5 ELISA titer curves of PKC θ (a) and Spartin (b) polyclonal antibodies

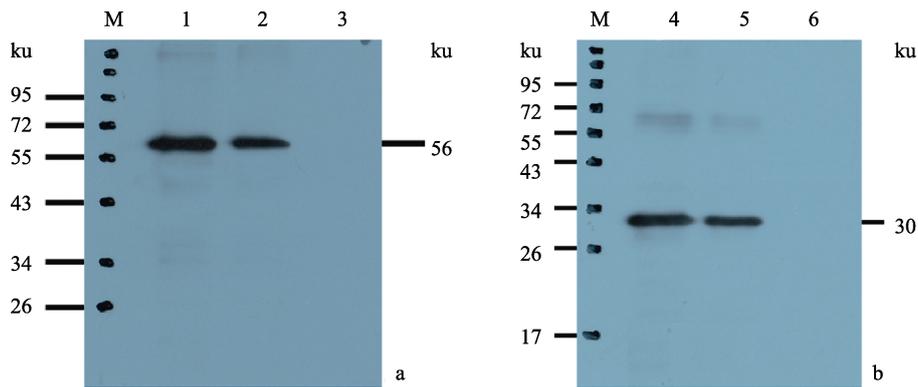


图 6 纯化 PKC θ (a) 和 Spartin (b) 多克隆抗体 SDS-PAGE 检测分析结果

Fig. 6 SDS-PAGE detection results of purified PKC θ and Spartin polyclonal antibodies

M. 蛋白质 Marker; 1. 25 ng PKC θ 多克隆抗体; 2. 10 ng PKC θ 多克隆抗体; 4. 25 ng Spartin 多克隆抗体; 5. 10 ng Spartin 多克隆抗体; 3, 6. 免疫前血清
 M. Standard protein Marker; 1. 25 ng PKC θ polyclonal antibody; 2. 10 ng PKC θ polyclonal antibody; 4. 25 ng Spartin polyclonal antibody; 5. 10 ng Spartin polyclonal antibody; 3,6: Serum before immunity

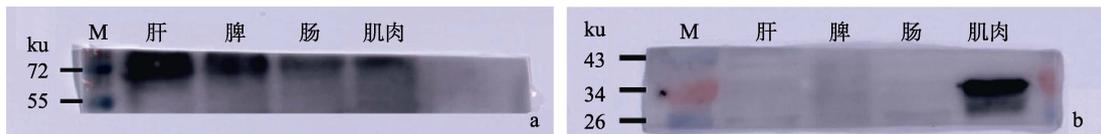


图 7 尼罗罗非鱼不同组织中 PKC θ (a) 和 Spartin (b) 的表达

Fig. 7 Expression of PKC θ (a) and Spartin (b) in different tissues of Nile tilapia

M. 蛋白质 Marker; 肝. Liver; 脾. Spleen; 肠. Intestine; 肌肉. Muscle
 M. Standard protein Marker

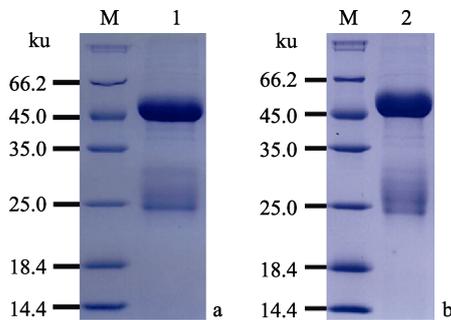


图8 纯化的 PKC θ 抗体 (a) 和 Spartin 抗体 (b)

Fig. 8 Purified PKC θ antibody (a) and Spartin antibody (b)

M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化的 PKC θ 抗体; 2. 纯化的 Spartin 抗体
M. Marker; 1. Purified PKC θ antibody; 2. Purified Spartin antibody

3 讨论

原核表达是外源基因融合表达的方式之一, 具有易培养、生长快、操作方便等优点(陈琼等 2017)。在本研究中, 利用无缝克隆技术构建尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 的原核表达载体, 并转入大肠杆菌 B21 中进行原核诱导表达, IPTG 诱导表达的 PKC θ 重组蛋白和 Spartin 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 分别在 56 ku 和 30 ku 处出现 1 条蛋白条带, 且沉淀中蛋白的含量显著高于上清液中蛋白的含量, 说明所表达的蛋白主要以不溶性的包涵体形式存在。在蛋白诱导表达过程中, 未经 IPTG 诱导的重组菌也能产生少量的目的蛋白, 这可能与蛋白的泄漏表达有关。在多克隆抗体制备过程中, 重组蛋白以包涵体的形式存在常见于报道。汪镇南等(2015)在制备猪腺病毒 3 型 Hexon 蛋白多克隆抗体时指出, 此蛋白原核表达以包涵体形式存在。羊口疮病毒(Orf virus, ORFV)蛋白 ORFV086(王小平等 2014)、狂犬病病毒 N 蛋白(罗扬 2014)、番鸭呼肠孤病毒 σ A 蛋白(吕小婷等 2016)、锦鲤疱疹病毒 ORF1 基因(张旻等 2012)等, 其重组蛋白主要以包涵体形式表达, 包涵体蛋白纯度较高、表达量大, 通过反复冻融和裂解能获得大量高纯度包涵体蛋

白。一般认为, 包涵体的形成主要因为在重组蛋白表达量过高、合成速度太快而缺乏某些蛋白质折叠的辅助因子, 导致无法形成正确的次级键(Carrió et al. 2000)。外源基因在大肠杆菌中诱导表达易出现不溶性的包涵体, 无法预测重组蛋白以包涵体形式表达或可溶形式表达, 主要与蛋白的亲疏水性相关, 也与诱导剂浓度、诱导温度等环境因素存在一定关系(罗扬 2014)。因此, 优化诱导剂浓度和诱导温度等环境条件, 可减少包涵体的形成, 增加可溶性蛋白的量。

Spartin 是几种亚细胞区室中的多功能蛋白质, 与内吞运输蛋白 Eps15 相互作用, 并在表皮生长因子受体(EGFR)的胞内运输过程中起作用(Bakowska et al. 2007)。Spartin 是哺乳动物 BMP 信号传导的抑制剂(Tsang et al. 2009)。目前尚未见鱼类 Spartin 的相关研究报道。本研究中, 尼罗罗非鱼 Spartin 编码 642 个氨基酸, 1 跨膜区, 279~298 aa 为跨膜区, 无信号肽序列, 局部亲水性好, 抗原表位较好, 适合用于抗原抗体制备。本研究选取 310~428 aa 表达蛋白进行多抗免疫, 实验结果表明, 表达的蛋白具有良好的免疫原性。获得的多克隆抗体, 效价达 1:512 000, 能特异性识别尼罗罗非鱼 Spartin 蛋白, 并在尼罗罗非鱼的肌肉组织中大量表达。本研究获得的重组蛋白和多克隆抗体可为尼罗罗非鱼 Spartin 功能研究提供物质基础。

PKC θ 在胰岛素抵抗的发展中起关键作用(Haasch et al. 2006)。PKC θ 在免疫系统中的重要作用使其受到了越来越多的关注, Fukahori 等(2015)研究了新型 PKC θ 选择性抑制剂 AS2521780 对大鼠(*Rattus norvegicus*)和食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*)急性排斥反应的影响。Patten 等(2007)研究发现, PKC θ 在斑马鱼中枢神经系统(CNS)和骨骼肌中表达。然而, 目前尚未见鱼类 PKC θ 功能研究的报道。本研究中, 尼罗罗非鱼 PKC θ 基因编码 720 个氨基酸, 无跨膜区, 无信号肽序列, 亲水性好,

选取 1~400 aa 进行表达, 实验结果表明, 表达的蛋白具有良好的免疫原性。获得的多克隆抗体, 效价达 1:512 000, 能特异性的识别尼罗罗非鱼 PKC θ 蛋白, 并在尼罗罗非鱼的肝、脾、肠和肌肉组织中表达。

本研究成功构建了尼罗罗非鱼 PKC θ 原核表达载体和 Spartin 原核表达载体, 高效表达的重组蛋白具有很好的免疫原性, 纯化后免疫大耳兔获得了高效价的多克隆抗体, 为进一步深入研究尼罗罗非鱼 PKC θ 和 Spartin 的功能提供了基础。

参 考 文 献

- Alberts P, Rotin D. 2010. Regulation of lipid droplet turnover by ubiquitin ligases. *BMC Biology*, 8(13): 94–97.
- Bakowska J C, Jupille H, Fatheddin P, et al. 2007. Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 18(5): 1683–1692.
- Carrió M M, Cubarsi R, Villaverde A. 2000. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *Febs Letters*, 471(1): 7–11.
- Ciccarelli F D, Proukakis C, Patel H, et al. 2003. The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics*, 81(4): 437–441.
- Edwards T L, Clowes V E, Tsang H T, et al. 2009. Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5. *Biochemical Journal*, 423(36): 31–39.
- Fukahori H, Chida N, Maeda M, et al. 2015. Effect of novel PKC θ selective inhibitor AS2521780 on acute rejection in rat and non-human primate models of transplantation. *International Immunopharmacology*, 27(2): 232–237.
- Geisler S, Holmstrom K M, Skujat D, et al. 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, 12(2): 119–131.
- Gur G, Bonfil D, Safarian H, et al. 2001. GnRH receptor signaling in tilapia pituitary cells: role of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129(2/3): 517–524.
- Haasch D, Berg C, Clampit J E, et al. 2006. PKC θ is a key player in the development of insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(2): 361–368.
- Harper M T, Poole A W. 2010. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(3): 454–462.
- Jiang G, Dandekar S. 2015. Targeting NF- κ B signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency. *Aids Research and Human Retroviruses*, 31(1): 4–12.
- Karlsson A B, Washington J, Dimitrova V, et al. 2014. The role of spartin and its novel ubiquitin binding region in DALIS occurrence. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8): 1355–1365.
- Lu J, Rashid F, Byrne P C. 2006. The hereditary spastic paraplegia protein spartin localises to mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 98(6): 1908–1919.
- Patten S A, Sihra R K, Dhami K S, et al. 2007. Differential expression of PKC isoforms in developing zebrafish. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25(3): 155–164.
- Pfeifhofer-Obermair C, Albrecht-Schgoer K, Peer S, et al. 2016. Role of PKC θ in macrophage-mediated immune response to *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Cell Communication and Signaling*, 14(1): 14.
- Renvoisé B, Stadler J, Singh R, et al. 2012. Spg20 $^{-/-}$ mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Human Molecular Genetics*, 21(16): 3604–3618.
- Robay D, Patel H, Simpson M A, et al. 2006. Endogenous spartin, mutated in hereditary spastic paraplegia, has a complex subcellular localization suggesting diverse roles in neurons. *Experimental Cell Research*, 312(35): 2764–2777.
- Truong T, Karlinski Z A, O'Hara C, et al. 2015. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: Protective effects of Spartin. *PLoS One*, 10(6): e0130455.
- Tsang H T, Edwards T L, Wang X, et al. 2009. The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Human Molecular Genetics*, 18(20): 3805–3821.
- 陈琼, 曹建萌, 卢迈新, 等. 2017. 尼罗罗非鱼 Ly75 基因的克隆、原核表达和多克隆抗体制备. *生物技术*, 27(3): 223–231.

- 李立彬. 2015. Spartin 蛋白在食管胃交界腺癌中的表达及意义. 石家庄: 河北医科大学硕士学位论文.
- 罗扬. 2014. 狂犬病病毒 N 和 G 蛋白多克隆抗体的制备. 南宁: 广西大学硕士学位论文.
- 吕小婷, 廖加磊, 孙雪宁, 等. 2016. 番鸭呼肠孤病毒 σA 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备. *中国兽医科学*, (2): 174–179.
- 汪镇南, 唐青海, 颜爱, 等. 2015. 猪腺病毒 3 型 Hexon 蛋白多克隆抗体制备与免疫活性鉴定. *中国畜牧兽医*, 42(1): 1–8.
- 王小平, 郝文波, 罗树红, 等. 2014. 抗羊口疮病毒蛋白 ORFV086 多克隆抗体的制备及其应用. *中国畜牧兽医*, 41(11): 7–13.
- 张广超, 杨晓秋, 姜国锋, 等. 2010. 蛋白激酶 C- θ 在脑膜瘤组织中的表达. *国际肿瘤学杂志*, 37(3): 228–229.
- 张旻, 郑晓聪, 林祥梅. 2012. 锦鲤疱疹病毒 ORF1 基因的克隆、表达及多克隆抗体的制备. *中国农学通报*, 28(5): 98–102.
- 张永德, 林勇, 冯鹏霏, 等. 2018. 尼罗罗非鱼 Lck 多克隆抗体的制备及鉴定. *南方农业学报*, 49(11): 2304–2310.