

DOI: 10.12131/20230012

文章编号: 2095-0780-(2023)04-0098-07

大口黑鲈 Nesfatin-1 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备

刘帆, 刘鑫鑫, 宋彩霞, 李西雷, 张君, 苏时萍

安徽农业大学 动物科技学院, 安徽合肥 230036

摘要: Nesfatin-1蛋白可以通过调节基因表达及信号通路途径影响鱼类的脂肪生成和代谢。为探究大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) Nesfatin-1蛋白的生理功能, 构建其原核表达质粒并进行蛋白表达纯化, 制备了该蛋白的鼠源多克隆抗体。通过扩增Nesfatin-1蛋白的基因序列, 构建原核表达载体获得pET32a-Nesfatin-1重组质粒。经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达, 镍离子亲和层析法纯化融合蛋白, 并免疫Balb/c小鼠, 获得针对Nesfatin-1的多克隆抗体。结果显示: 大口黑鲈Nesfatin-1蛋白的基因序列为246 bp; Nesfatin-1融合蛋白在菌液上清液中的质量浓度为 $1.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相对分子质量约为30 kD; Western blot结果显示多克隆抗体能与重组蛋白特异性结合; 间接ELISA检测该抗体效价达到1:204 800以上; 免疫组织荧光结果显示该抗体能特异性识别大口黑鲈肝胰腺中的蛋白, 弥散性分布于肝胰腺中且血管周围呈强阳性反应。研究成功表达纯化出大口黑鲈Nesfatin-1融合蛋白, 并制备了特异性鼠源多克隆抗体, 为后续深入研究Nesfatin-1生物学作用提供了功能性蛋白与特异性抗体。

关键词: 大口黑鲈; Nesfatin-1蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of Nesfatin-1 protein in *Micropterus salmoides*

LIU Fan, LIU Xinxin, SONG Caixia, LI Xilei, ZHANG Jun, SU Shiping

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Nesfatin-1 protein can affect fish adipogenesis and metabolism by regulating gene expression and signaling pathways. To investigate its physiological functions in largemouth bass (*Micropterus salmoides*), we constructed and purified a prokaryotic expression plasmid, and prepared a murine polyclonal antibody to this protein. The pET32a-Nesfatin-1 recombinant plasmid was obtained by amplifying the gene sequence of Nesfatin-1 protein and constructing a prokaryotic expression vector. The protein expression was induced by isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG), and the fusion protein was purified by nickel ion affinity chromatography and immunized in Balb/c mice to obtain a polyclonal antibody against Nesfatin-1. The results show that the Nesfatin-1 protein had a gene sequence length of 246 bp; the concentration of the Nesfatin-1 fusion protein in the supernatant of the bacterial broth was $1.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and its relative molecular mass was 30 kD. Western blot analysis shows that the polyclonal antibody could specifically bind to the recombinant protein; the potency of the antibody reached over 1:204 800 by indirect ELISA. The results of immunofluorescence detection indicates that the antibody specifically recognized the protein in the hepatopancreas of largemouth bass and was diffusely distributed in the hepatopancreas, showing strong positive reaction around the blood vessels. In this study, the Nesfatin-1 fusion protein of largemouth bass was successfully expressed and purified,

收稿日期: 2023-02-15; 修回日期: 2023-03-09

基金项目: 安徽省水产产业技术体系(〔2021〕711)

作者简介: 刘帆(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传与育种。E-mail: liufan430@163.com

通信作者: 苏时萍(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产动物遗传与育种。E-mail: sushiping@ahau.edu.cn

and a specific murine polyclonal antibody was prepared, which can provide the functional protein and specific antibody for further study of the biological role.

Keywords: *Micropterus salmoides*; Nesfatin-1 protein; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 属鲈形目、太阳鱼科、黑鲈属, 俗称鲈鱼, 于 20 世纪 80 年代引入中国并进行人工繁殖。因具有适温广、生长速度快、养殖周期短、产量高、抗病力强等优点^[1-2], 且肉质鲜美无肉间刺, 已成为中国重要的淡水经济养殖品种之一。鲈鱼养殖模式也从投喂冰鲜小鱼向人工配合饲料转变^[3]。由于养殖模式、饲料配方及养殖水环境的影响, 养殖鲈的体脂含量会大量沉积, 致使机体组织器官受损^[4-5], 生长受到抑制, 甚至出现死亡^[6]。与蛋白质相比, 脂类是成本较低的能量来源, 特别是以脂质为主要能量来源的肉食性鱼类^[7]。有研究表明, 饲料中的脂肪水平达到 11.05% 时, 会影响脂质沉积, 易损伤大口黑鲈肝功能^[8], 导致其体内代谢紊乱。

Nesfatin-1 是核连蛋白 2 (NUCB2) 基因编码的由 82 个氨基酸组成的厌食肽。NUCB2 裂解产物除 Nesfatin-1 外, 还包括 Nesfatin-2 和 Nesfatin-3, 对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 脑室分别注射这 3 个片段, 仅 Nesfatin-1 可抑制大鼠摄食并降低脂肪沉积, 其他肽段并无此功能^[9], 因此 Nesfatin-1 是 NUCB2 的功能核心片段。Nesfatin-1 具有调节摄食^[10]、胃肠道^[11]、生殖^[12]、血糖^[13] 等多种生物学功能, 尤其是脂肪代谢^[14]。在 Nesfatin-1 参与机体脂质代谢调节的研究中, Sima 等^[15] 证明 Nesfatin-1 参与调节小鼠 (*Mus musculus*) 肝脏脂质代谢并降低外周脂肪的累积; Yin 等^[16] 与 Dong 等^[17] 研究显示, Nesfatin-1 可以通过调节基因表达以及信号通途径来影响脂肪生成和代谢。综上, 关于 Nesfatin-1 肽段功能及通路的研究是当下研究热点, 探究其在大口黑鲈中的生物学功能及互作蛋白, 制备特异性抗体将有助于其功能和信号通路的研究, 可为解决大口黑鲈养殖饲料问题提供理论依据。

本研究从大口黑鲈肝胰腺中克隆获得 Nesfatin-1 蛋白的基因序列, 通过构建原核表达载体获得 Nesfatin-1 重组蛋白, 免疫 Balb/c 小鼠获得多克隆抗体并对免疫原性进行鉴定, 证明该抗体能特异性识别大口黑鲈 Nesfatin-1 蛋白, 为进一步探索 Nesfatin-1 蛋白在大口黑鲈脂质代谢中的作用及机

制提供功能性蛋白和特异性抗体, 同时也为 Nesfatin-1 的生理功能以及信号通路研究提供材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大口黑鲈购自中国海大集团安徽鲈鱼繁育基地, SPF 级 Balb/C 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心, pET-32a 质粒为本实验室保存。Trizol、反转录试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态和 BL21 感受态、胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等均购自北京全式金生物技术有限公司, TMB 显色液、DAB 显色液购自生工生物工程(上海)股份有限公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司, 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和商品化抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

在无菌条件下取大口黑鲈肝胰腺组织, 利用 Trizol 法提取样品总 RNA, 以 260 和 280 nm 处吸光度比值为 2 作为 RNA 质量和纯度的标准, 用 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。总 RNA 经过反转录获得 cDNA, 以其为模板用于 PCR 扩增。

根据 GenBank 上发表的大口黑鲈 NUCB2a 基因预测序列 (登录号: XM_038700643.1), 利用 Primer 6.0 软件设计特异性引物, 上游引物序列: 5'-CCCGAATTCATGGTGCCCATCAGTATGG-3', 下游引物序列: 5'-CCGCTCGAGGCTACAAC-CATCCAGTTTTG-3', 划线处是 *Eco*R I/*Xho* I 酶切位点, 该引物由上海赛恒生物科技有限公司合成。

1.3 Nesfatin-1 蛋白的基因扩增、测序

以 cDNA 为模板, 用合成的特异性引物进行 PCR 扩增, 50 μ L 的 PCR 反应体系: cDNA 模板 2 μ L, Prime star Max Premix (2 \times) 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, 19 μ L 灭菌双蒸水。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火

30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 35 个循环。用 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 扩增产物, 目的片段用胶回收试剂盒回收并与 pEasy-T 载体连接, 在 25 °C 下连接 10 min, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 并涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 蓝白斑筛选平板, 37 °C 培养过夜后筛选阳性克隆 (命名为 pEasy-T-Nesfatin-1), 送至上海赛恒生物科技有限公司测序验证。

1.4 载体的构建

在 37 °C 下将 pEasy-T-Nesfatin-1 重组质粒和 pET-32a (+) 载体分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 2 h, 酶切产物经 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳分离, 纯化回收后按 n (质粒) : n (片段) = 3 : 7, 使用 Fast T4 DNA 连接酶连接, 转化至 DH5 α 感受态细胞后 PCR 筛选阳性克隆, 送至上海赛恒生物科技有限公司测序, 将鉴定正确的阳性克隆接种于含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中培养过夜, 提取重组质粒命名为 pET-32a-Nesfatin-1。

1.5 蛋白诱导表达

将重组质粒 pET-32a-Nesfatin-1 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 接种于含氨苄抗生素的 LB 培养基中, 振荡培养, 待 OD_{600 nm} 值达到 0.6 时, 加入终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导表达, 4 h 后离心收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测。以 IPTG 最佳诱导浓度诱导蛋白表达后, 在 16 °C 摇床中培养 15 h。在 4 °C 下 8 000 r·min⁻¹ 离心 8 min 收集菌体; 然后用 PBS (pH 7.4) 反复洗涤、离心后, 将收集的菌体吹打混匀, 置于超低温冰箱反复冻融 3 次, 超声破碎仪设置为超声时间 5 s, 间隙时间 7 s, 总时间 25 min, 功率 35%。冰浴中超声破碎后, 分别收集上清和沉淀制样后进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 蛋白纯化和测定

采用 His 蛋白标签的镍柱亲和层析方法纯化目的蛋白, 镍柱用纯水与 PBS 分别清洗 6 次, 将破碎上清注入镍柱中并封口, 置于摇床, 冰上孵育 1 h。收集穿透液, 用浓度梯度为 10、40、80、100 mmol·L⁻¹ 的咪唑溶液收集目的蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析。洗脱下的目的蛋白用透析液复性, 每 12 h 更换透析液, 纯化后的 Nesfatin-1 蛋白于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。纯化后蛋白浓度采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。

1.7 抗体的制备与效价检测

以 6 周龄 BALB/c 小鼠作为免疫动物, 首次免疫将 100 μ g 纯化后的 Nesfatin-1 融合蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混匀乳化, 经多点皮下注射。2 周后进行加强免疫, 将同等剂量融合蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合后多点皮下注射。最后一次加强免疫 1 周后采血, 室温静置 1 h 后分离血清, 分装后于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

效价检测是用碳酸盐包被液将纯化的 Nesfatin-1 融合蛋白稀释到 100 ng·mL⁻¹ 包被酶标板中, 每孔 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h 后拍干, TBST 重复洗涤, 待测血清为一抗, 从 1 : 200 梯度稀释到 1 : 204 800, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 经四甲基苯胺 (TMB) 溶液显色后用酶标仪测定 OD_{450 nm} 值。其中抗体效价标准为检测孔与阴性对照孔 OD_{450 nm} 的比值 \geq 2.1 时的稀释度。阴性对照为未免疫小鼠血清, PBS 缓冲液为空白对照, 每个样本重复 3 次, 结果取平均值。

1.8 特异性检测

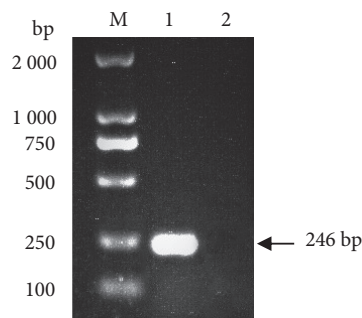
Western blot 检测: 取纯化后的 Nesfatin-1 融合蛋白制样, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳转到 PVDF 膜上 (300 mA 恒流转膜 60 min)。经 TBST 清洗 PVDF 膜后, 室温用 5% (w) 脱脂奶粉封闭 2 h, 用 TBST 洗膜 2 次, 每次 5 min。将抗体血清 1 : 1 000 稀释后作为一抗, 在 4 °C 下水平摇床过夜孵育。再用 TBST 清洗 4 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 经 1 : 1 000 稀释后作为二抗, 室温下孵育 2 h, 用 TBST 清洗 4 次, 每次 5 min, 最后用 DAB 显色液显色。

免疫组织荧光检测: 随机选取 3 尾大口黑鲈, 用 4% (φ) 多聚甲醛固定肝胰腺组织, 进行石蜡包埋、切片, 切片放入 60 °C 恒温烘箱 6 h, 自然冷却至室温。经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水后, 置于 0.1 mol·L⁻¹、pH 6.0 枸橼酸修复液中加热充分修复, 自然冷却至室温。修复后的切片滴加 DPBS 覆盖组织, 滴加 10% 封闭血清覆盖组织, 室温封闭 30 min。添加抗 Nesfatin-1 血清 4 °C 孵育过夜, 然后在避光条件下添加 FITC 标记的二抗 (1 : 150 比例稀释抗体), PBS 缓冲溶液清洗 3 次加入 DAPI, 室温染色 10 min, PBS 缓冲溶液清洗 5 次, 每次 5 min, 封片后使用激光共聚焦显微镜 (型号: FV1000) 观察并拍照记录。

2 结果

2.1 Nesfatin-1 蛋白的基因扩增及原核表达载体的构建

根据 PCR 扩增获得 Nesfatin-1 蛋白的基因大小为 246 bp (图 1), 将目的基因切胶回收连接到 pEasy-T 载体中, 获得重组载体 pEasy-T-Nesfatin-1。将重组载体与 pET-32a (+) 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切并连接, 获得重组质粒 pET-32a-Nesfatin-1。将重组质粒送至上海赛恒生物科技有限公司测序, 经 DNAMAN 软件比对序列一致无误, 表明重组质粒构建成功。



M. Marker 2 000; 1. PCR 扩增产物; 2. 阴性对照。
M. Marker 2 000; 1. Amplification products; 2. Negative control.

图1 Nesfatin-1 蛋白的基因扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of gene amplification product of Nesfatin-1 protein

2.2 Nesfatin-1 融合蛋白的诱导表达及表达形式的确定

将导入 pET-32a-Nesfatin-1 重组质粒的 BL21 大肠杆菌置于含有氨苄抗生素的培养液中, 不同终

浓度的 IPTG 对其诱导, 离心后收集菌液并制样, 最后进行 SDS-PAGE 分析, 结果 (图 2-a) 显示, 在 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 终浓度的 IPTG 诱导下蛋白表达量最高, 泳道出现在约 30 kD 的位置, 与预期融合蛋白大小一致, 超声破碎后, 菌体分离上清和沉淀并进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示, 融合蛋白主要存在于上清液中, 为可溶性蛋白 (图 2-b)。

2.3 蛋白的纯化效果以及浓度的测定

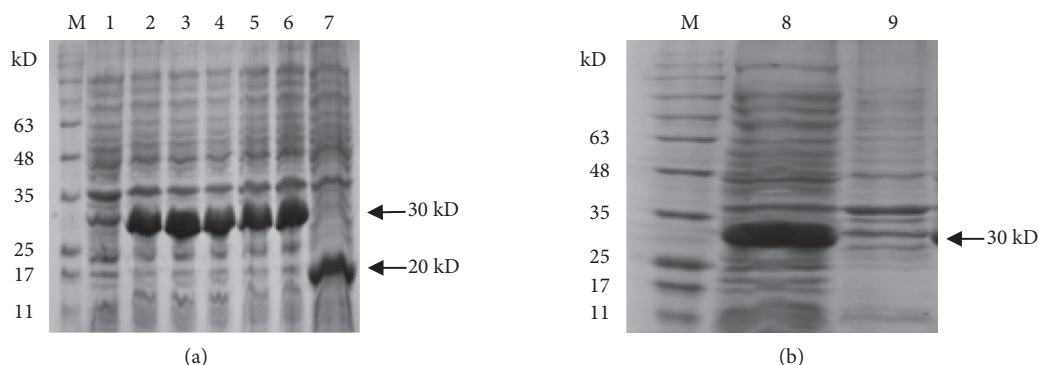
由于融合蛋白带有 His 标签, 所以将收集的上清液采用镍柱亲和层析的方法对融合蛋白进行纯化, 结果显示镍柱能够有效吸附目的蛋白 (图 3), 透析去除咪唑, 分析表明 $80 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 咪唑浓度洗脱时, 获得了浓度与纯度较高的目的蛋白, 此方法能够有效获得 Nesfatin-1 融合蛋白。同时采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化后 Nesfatin-1 融合蛋白的质量浓度为 $1.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4 抗体效价

经间接 ELISA 确定多克隆抗体的效价, 取 3 次重复实验结果的平均值, 阳性血清 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 与阴性血清 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 的比值大于 2.1 的血清稀释度为待测血清的效价, PBS 作为空白对照, 其值均小于 0.1, 结果显示, 待测血清效价大于 1 : 204 800 (表 1)。

2.5 特异性检测

将纯化后的融合蛋白制样, 动物免疫获得的血清作为一抗, Western blot 分析结果显示 (图 4), 检测到单一蛋白条带大小约为 30 kD, 与融合蛋白诱导结果大小一致。结果表明制备的多克隆抗体可



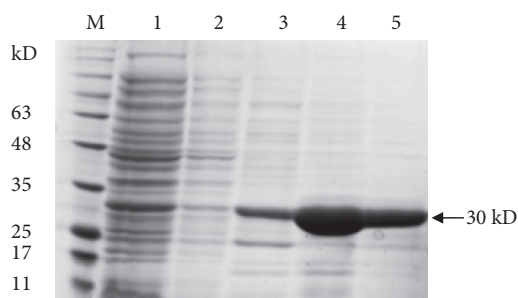
M. 预染蛋白 Marker; 1. 阴性对照; 2—6. 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 诱导; 7. 空载体对照; 8. 上清液; 9. 沉淀。
M. Prestained protein Marker; 1. Negative control; 2—6. 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 and $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG inductions; 7. pET32a as control; 8. Supernatant; 9. Precipitate.

图2 蛋白诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

a. IPTG 浓度对 pET-32a-Nesfatin-1 蛋白表达的影响; b. pET-32a-Nesfatin-1 融合蛋白的表达形式。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression products

a. pET-32a-Nesfatin-1 protein expression in BL21 under different IPTG concentration conditions; b. Type of pET-32a-Nesfatin-1 fusion protein.



M. 预染蛋白 Marker; 1. 穿透液; 2—5. 10、40、80、100 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱液。
M. Prestained protein Marker; 1. Fow-through; 2—5. Elution buffer with 10, 40, 80, 100 mmol·L⁻¹ imidazole.

图3 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of protein after purification

表1 ELISA 检测多克隆抗体效价

Table 1 Titer of polyclonal antibody detected by ELISA

稀释 Dilution	多克隆抗体 ^① P	阴性对照 ^② N	比值 P/N	空白对照 PBS
1 : 100	2.51	0.25	9.97	0.09
1 : 200	2.46	0.16	15.38	0.07
1 : 400	2.37	0.11	21.55	0.08
1 : 800	2.17	0.08	27.13	0.06
1 : 1 600	1.95	0.07	27.86	0.06
1 : 3 200	1.87	0.06	31.17	0.06
1 : 6 400	1.53	0.07	21.86	0.05
1 : 12 800	1.23	0.06	20.50	0.07
1 : 25 600	0.94	0.06	15.67	0.06
1 : 51 200	0.73	0.06	12.17	0.06
1 : 102 400	0.54	0.06	9.00	0.05
1 : 204 800	0.36	0.06	6.00	0.06

注: ① 表示两组待测多抗检测结果的平均值; ② 表示两组阴性对照检测结果的平均值。

Note: ① Means of two groups of polyclonal antibody results; ② Means of two groups of negative control results.

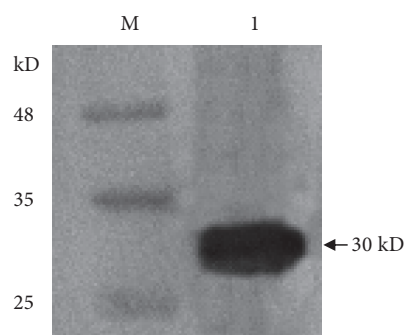
以特异性识别 Nesfatin-1 融合蛋白。

2.6 肝胰腺组织免疫荧光验证

通过激光共聚焦荧光显微镜观察发现 (图 5), 制备的多克隆抗体可以识别大口黑鲈肝胰腺组织中的 Nesfatin-1 蛋白, 且蛋白主要定位于血管周围, 呈弥散分布。

3 讨论

目前, 在大口黑鲈养殖生产中普遍存在脂质代谢紊乱的问题, 导致其生长受阻、病害增多, 严重影响其产业的可持续发展。Nesfatin-1 在体内参与



M. 预染蛋白 Marker; 1. 纯化后的融合蛋白。
M. Prestained protein Marker; 1. Purified fusion protein.

图4 Western blot 检测 Nesfatin-1 蛋白多克隆抗体的特异性

Fig. 4 Identification of specificity of anti-Nesfatin-1 polyclonal antibody by Western blot

了脂质代谢的调节, 脑室内注射 Nesfatin-1 后脂肪代谢相关基因 mRNA 发生变化, 且脂肪减少以及脂肪酸氧化能力增强^[18]; 在小鼠体内慢性皮下注射 Nesfatin-1 后血浆中的胆固醇和甘油三酯水平均降低^[11]; 在 2 型糖尿病小鼠中, 静脉注射 Nesfatin-1 增加了骨骼肌中脂肪酸氧化酶 AMPK 和乙酰 CoA 羧化酶磷酸化的表达^[17]。以上研究均表明 Nesfatin-1 对脂质代谢调节有促进作用, 但缺乏对 Nesfatin-1 蛋白水平的检测, 导致未深入研究蛋白水平中 Nesfatin-1 对脂质代谢的生理机制。因此, 进行大口黑鲈 Nesfatin-1 蛋白原核表达载体构建及抗体制备, 将促进该蛋白在调节脂质代谢机理研究中的深入开展, 为其在大口黑鲈养殖生产上的应用提供前提条件。

Nesfatin-1 在体内分布广泛且具有多种生物学功能, 采用 Nesfatin-1 合成肽对其功能以及通路的研究在哺乳动物和鱼类中均已有报道, 但由于合成肽产量小、价格昂贵, 不利于常规实验研究^[19]。相比之下, 原核表达重组蛋白具有操作简单、易大规模生产、蛋白表达量高、易于纯化等优点^[20], 因此被广泛用于表达外源基因。本研究采用大肠杆菌外源蛋白表达系统, 可快速大规模生产蛋白, 然而, 真核蛋白在原核表达系统中易形成不可溶的包涵体形式^[21]。已有研究表明, 重组蛋白的诱导条件会影响外源蛋白的可溶性表达^[22]。本研究为了获得更多的可溶性重组蛋白, 对表达条件进行了优化; 结果显示, 在 0.4 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导浓度下蛋白表达量最大, 而 IPTG 诱导时间对表达量的影响不明显。另有研究表明, 温度较高虽会使重组蛋白大量且快速表达, 但会促进蛋白以包涵体形式存在, 而较低的温度会增加蛋白的准确折叠率^[23]。

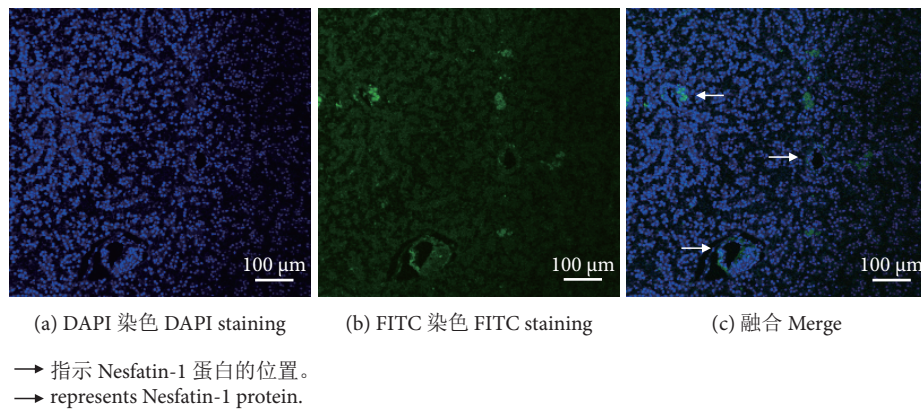


图5 Nesfatin-1 蛋白在大口黑鲈肝胰腺组织中的定位

Fig. 5 Localization of Nesfatin-1 protein in hepatopancreas of *M. salmoides*

本研究降低了培养温度, 在 16 °C 下成功将 Nesfatin-1 融合蛋白诱导为可溶性蛋白。

此外, 有研究报道, 添加硫氧还蛋白 (TRX)、谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 和麦芽糖结合蛋白 (MBP) 等常用的融合标签能提高外源蛋白的可溶性表达^[24]。pET32a (+) 载体中携带有 TRX 标签以及双融合伴侣, 能够用于蛋白的表达和纯化^[25]。pET32a (+) 载体含有 6×His 标记, 重组蛋白可利用 His 标签进行亲和层析纯化蛋白, 使目的蛋白的表达状态不受影响, 利于融合蛋白的鉴定和纯化; 因此, 本研究采用 pET32a (+) 载体诱导表达和纯化出高纯度大口黑鲈 Nesfatin-1 融合蛋白。

目前, 利用原核表达获得重组蛋白制备抗体的方法已被广泛应用于分子生物学研究。例如, 沈娇娇^[26]采用 pET32a (+) 载体对结构蛋白-基质蛋白进行原核表达并制备多克隆抗体, 其抗体效价为 1 : 102 400; 李沛轩等^[27]制备的针对双峰驼 FcαR 的抗体效价为 1 : 64 000; 牛支原体蛋白表达的抗体效价为 1 : 51 200^[28]。本实验通过原核表达获得 Nesfatin-1 融合蛋白, 将其用于小鼠的免疫, 制备多克隆抗体, 通过间接 ELISA 检测抗体效价达到 1 : 204 800 以上, 说明 Nesfatin-1 融合蛋白具有较好的免疫原性, 可以诱导小鼠产生特异性抗体; Western blot 检测该抗体能够特异性识别纯化后的 Nesfatin-1 蛋白; 在间接免疫荧光实验中, 利用该抗体对大口黑鲈肝胰腺组织中的 Nesfatin-1 蛋白进行定位, 结果证实获得的抗体能识别大口黑鲈的肝胰腺组织内源表达的 Nesfatin-1 蛋白, 并呈弥散性分布在血管周围, 说明制备的多克隆抗体不仅能识别融合蛋白, 还能特异性检测体内分泌的 Nesfatin-1 蛋白, 为后续研究奠定了基础。本研究

选择肝胰腺组织作为实验材料, 是因为鱼类肝胰腺是甘油三酯合成的主要场所^[29], 而甘油三酯是脂质代谢中的重要产物。佟春萌等^[30]基于大口黑鲈胰腺组织学的观察结果显示, 内分泌腺主要分布于总胆管周围, 外分泌腺除了包裹于胰岛之外也分布于肝脏中, 胰腺的分布属于弥散型。所以该抗体识别 Nesfatin-1 蛋白特异性定位于胰腺组织, 本研究结果与前期 Nesfatin-1 蛋白在胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 肝胰脏组织的定位一致, 均在胰腺细胞中呈强阳性反应^[31], 说明可能与其消化和代谢功能相对应, 同时也表明本实验制备的抗体特异性高且与抗原结合能力强。基因与蛋白功能研究中缺乏特异性蛋白和抗体, 会导致体内和体外模型的建立及蛋白检测效果不够准确, 制约其相关功能的深入研究。至今仍未发现 Nesfatin-1 受体, 无特异性拮抗剂和激动剂, 因此有关其信号通路的研究非常缺乏。Nesfatin-1 特异性抗体的制备, 将会增加 Nesfatin-1 受体发现机率并促进特异性拮抗剂和激动剂的开发。另有研究表明, 多克隆抗体可用于分析鸡肝细胞核因子 (HNF4α) 在各组织中的表达情况^[32], 免疫共沉淀及受体封闭实验也可用于相关受体的筛选与鉴定^[33]。因此, 本实验获得的多克隆抗体可用于后续脂质代谢蛋白的互作研究。综上, 针对大口黑鲈 Nesfatin-1 制备的多克隆抗体为今后 Nesfatin-1 组织分布表达与定位以及受体筛选研究奠定了基础。

4 结论

本研究成功构建了大口黑鲈 Nesfatin-1 的原核表达载体, 优化了重组蛋白诱导表达条件, 成功获得了纯化的蛋白, 并制备了高效价多克隆抗体, 且

具有良好的生物学特异性, 可为 ELISA 检测、免疫组织化学检测提供特异性蛋白和抗体。因 Nesfatin-1 在鱼类中的保守性, 可以广泛应用于鱼类 Nesfatin-1 生理功能的研究, 也为后期深入研究大口黑鲈 Nesfatin-1 的脂质代谢调节机制、功能及生产性应用奠定基础。

参考文献:

- [1] 白俊杰, 李胜杰. 我国大口黑鲈产业现状分析与对策 [J]. 中国渔业经济, 2013, 31(5): 104-108.
- [2] 韩晓磊, 王浩, 高俊杰, 等. 工厂化循环水养殖条件下大口黑鲈生长特点分析 [J]. 水产科学, 2020, 39(4): 567-572.
- [3] 李武辉, 孙成飞, 董浚键, 等. 大口黑鲈开口摄食与转食人工配合饲料期消化系统发育特征 [J]. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 80-89.
- [4] 满铭叁, 隋仲敏, 周慧慧, 等. 饲料中脂肪水平及脂肪源对大菱鲆幼鱼生长和代谢的影响 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2020, 50(10): 26-36.
- [5] 池作授, 耿旭, 郭云学, 等. 奥尼罗非鱼仔稚鱼饲料中适宜脂肪水平的研究 [J]. 中国饲料, 2010(20): 32-36.
- [6] 彭祥和. 大口黑鲈对高脂饲料的生理适应机制 [D]. 重庆: 西南大学, 2017: 25.
- [7] XIE S W, YIN P, TIAN L X, et al. Dietary supplementation of astaxanthin improved the growth performance, antioxidant ability and immune response of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed high-fat diet [J]. Mar Drugs, 2020, 18(12): 642.
- [8] 朱婷婷, 金敏, 孙蓬, 等. 饲料脂肪水平对大口黑鲈形体指标、组织脂肪酸组成、血清生化指标及肝脏抗氧化性能的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(1): 126-137.
- [9] OH I S, SHIMIZU H, SATOH T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus [J]. Nature, 2006, 443(7112): 709-712.
- [10] SAITO R, SONODA S, UENO H, et al. Involvement of central nesfatin-1 neurons on oxytocin-induced feeding suppression in rats [J]. Neurosci Lett, 2017, 655: 54-60.
- [11] ATSUCHI K, ASAKAWA A, USHIKAI M, et al. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice [J]. Neuroreport, 2010, 21(15): 1008-1011.
- [12] SCHALLA M A, STENGEL A. The role of the gastric hormones ghrelin and nesfatin-1 in reproduction [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11059.
- [13] GONZALEZ R, REINGOLD B K, GAO X D, et al. Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet beta- and MIN6 cells [J]. J Endocrinol, 2011, 208(3): R9-R16.
- [14] ZEGERS D, BECKERS S, MERTENS I L, et al. Association between polymorphisms of the Nesfatin gene, NUCB2, and obesity in men [J]. Mol Genet Metab, 2011, 103(3): 282-286.
- [15] SIMA M, RONALD G, ROLANDO C, et al. Long-term infusion of nesfatin-1 causes a sustained regulation of whole-body energy homeostasis of male Fischer 344 rats [J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3: 22.
- [16] YIN Y, LI Z R, GAO L, et al. AMPK-dependent modulation of hepatic lipid metabolism by nesfatin-1 [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 417(C): 20-26.
- [17] DONG J, XU H, XU H, et al. Nesfatin-1 stimulates fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase in stz-induced type 2 diabetic mice [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83397.
- [18] BLANCO A M, VELASCO C, BERTUCCI J I, et al. Nesfatin-1 regulates feeding, glucosensing and lipid metabolism in rainbow trout [J]. Front Endocrinol, 2018, 9: 484.
- [19] FIELD C M, OEGEMA K, ZHENG Y, et al. Purification of cytoskeletal proteins using peptide antibodies [J]. Methods Enzymol, 1998, 298: 525-541.
- [20] HAYAT S M G, FARAHANI N, GOLICHENARI B, et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know [J]. Curr Pharm Design, 2018(6): 718-725.
- [21] 张磊, 唐永凯, 李红霞, 等. 促进原核表达蛋白可溶性的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(Z1): 138-149.
- [22] 马媛媛, 何健民, 康永杰. 外源性蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的策略综述 [J]. 世界科技研究与发展, 2015, 37(5): 627-630.
- [23] SORENSEN H P, MORTENSEN K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. Microb Cell Fact, 2005, 4: 1.
- [24] ZHOU P, WAGNER G. Overcoming the solubility limit with solubility-enhancement tags: successful applications in biomolecular NMR studies [J]. J Biomol NMR, 2010, 46(1): 23-31.
- [25] COSTA S, ALMEIDA A, CASTRO A, et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 63.
- [26] 沈娇娇. 鱼类出血性败血症病毒基质蛋白原核表达、多克隆抗体制备及应用 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018: 33.
- [27] 李沛轩, 刘晓霞, 刘丽萍, 等. 双峰驼 Fc α R 基因的原核表达、抗体制备及其在脾脏中的表达模式 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(10): 1944-1953.
- [28] 白宇彤, 黄志成, 李章程, 等. 牛支原体 MBOVPG45_0212 的原核表达及其免疫原性分析 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52(12): 1538-1544.
- [29] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝 [J]. 动物营养学报, 2006(4): 294-298.
- [30] 佟春萌, 陈乃松, 季振尧, 等. 大口黑鲈胰腺的组织学观察 [J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(6): 814-819.
- [31] 苏时萍, 李卿青, 谢启明, 等. 胭脂鱼核连蛋白 2/Nesfatin-1 基因克隆及其在间脑与肝胰脏中的差异表达 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2021, 47(5): 637-646.
- [32] 王中亮. 鸡 VNN1 基因在肝脏脂代谢中的功能及其调控机制的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 90.
- [33] 刘爱晶. 传染性法氏囊病毒细胞受体的筛选及鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2022: 22.