

## 鲤*slc15a1*基因的多克隆抗体制备及其表达分析

姜洲, 张猛, 刘凯月, 薛亚果, 邵嘉棋, 李学军, 董传举

### Preparation of polyclonal antibodies to *Cyprinus carpio slc15a1* gene and its expression analysis

JIANG Zhou, ZHANG Meng, LIU Kaiyue, XUE Yaguo, SHAO Jiaqi, LI Xuejun, DONG Chuanju

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210103283>

#### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

##### miR-192在尼罗罗非鱼应答碱度胁迫中的表达及靶基因

Expression of miR-192 in Nile tilapia in response to alkalinity stress and verification of target genes

上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 407 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302946>

##### 斑马鱼肿瘤坏死因子(*tnf $\alpha$* )及其受体(*tnfrsf1a*)应答细菌和病毒感染的表达

Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor (*tnf $\alpha$* ) and its receptor (*tnfrsf1a*) in response to bacterial and viral infections

上海海洋大学学报. 2020, 29(2): 171 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302560>

##### 两种体色瓯江彩鲤黑色素形成比较

Formation of melanin and *mitfa* in-situ in the Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 481 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190502668>

##### 传染性胰脏坏死病酵母展示疫苗的免疫效果评价

Evaluation of immune protection effect of a vaccine constructed using yeast display against infectious pancreatic necrosis

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 866 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-304>

##### 斑马鱼*nos2a*基因的生长调控作用

Role of *nos2a* in regulating the growth of zebrafish (*Danio rerio*)

上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 573 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703099>

文章编号: 1674-5566(2022)01-0019-10

DOI:10.12024/jsou.20210103283

## 鲤 *slc15a1* 基因的多克隆抗体制备及其表达分析

姜 洲<sup>1</sup>, 张 猛<sup>1</sup>, 刘凯月<sup>1</sup>, 薛亚果<sup>1,2</sup>, 邵嘉棋<sup>1,3</sup>, 李学军<sup>1</sup>, 董传举<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007; 2. 厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361005; 3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

**摘 要:** 鲤 (*Cyprinus carpio*) *slc15a1* 基因是利用质子梯度逆浓度转运小肽和肽类似物到各种组织细胞内的一种低亲和力、高容量的转载体, 该基因在免疫反应中也起到重要作用。从蛋白质水平上探究 *slc15a1* (*slc15a1a* 和 *slc15a1b*) 基因在鲤体内免疫应答机制中的变化, 将 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 基因含有部分抗原决定簇的片段加入双酶切位点 *BamH* I 和 *Hind* III 后连接至 pET-32a(+), 构建表达载体, 并成功制备鼠源 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 基因多克隆抗体。采用 ELISA 法检测抗体效价, 获得的鼠抗 Slc15a1a 和 Slc15a1b 的效价分别为  $8.1 \times 10^5$  和  $2.7 \times 10^5$ 。在嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染后, Slc15a1a 和 Slc15a1b 的最高蛋白表达水平与空白对照相比, 分别增加了 3.39 和 2.85 倍, 说明本实验制备的多克隆抗体具有较高的亲和力、特异性和较强的免疫原性, 能够及时地诱导机体产生免疫应答。Slc15a1a 在嗜水气单胞菌感染后 3 h 和 6 h 迅速做出高表达量响应, 在 12 h 后开始出现表达水平的下降, 但 Slc15a1b 在 3 ~ 24 h 时却一直维持着较稳定的高表达响应, 表明 Slc15a1a 和 Slc15a1b 之间具有一定的表达差异。在感染过程中, Slc15a1a 的表达量基本高于 Slc15a1b, 因此 *slc15a1a* 基因可能是 *slc15a1* 基因的主效基因, 在鲤免疫应答过程中发挥重要作用。

**关键词:** 鲤; *slc15a1* 基因; 抗体; 嗜水气单胞菌

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

质子转载体 15 基因家族 (Solute carrier15 family, Slc15) 的主要作用是利用质子梯度和负膜电位进行二/三肽和拟肽分子的跨膜转运, 因此也被称为寡肽转载体基因家族 (proton-coupled oligopeptide transporters, POTs)<sup>[1]</sup>。*slc15* 基因家族在鱼类中共有 5 个成员, 分别为 *slc15a1* (PEPT1)、*slc15a2* (PEPT2)、*slc15a3* (PHT2)、*slc15a4* (PHT1) 和 *slc15a5*<sup>[2]</sup>。其中对 *slc15a1* 和 *slc15a2* 的组织分布、底物特性和转运功能的研究较早。*slc15a1* 广泛分布在肠上皮细胞的刷状缘膜以及肾近曲小管细胞等多种组织中, 是一个高容量、低亲和力质子转载体。在消化道中, *slc15a1* 小肽转运系统与游离氨基酸的吸收效率相比, 具有转运速度快、耗能低、不易饱和的特点<sup>[3]</sup>, 会优先吸收含 L 型氨基酸的二肽和三肽<sup>[4]</sup>及各种类型的模拟肽, 如  $\beta$ -内酰胺类抗生素<sup>[5]</sup>、血管紧张素转换酶抑制剂、肾素抑制剂、氨肽酶

抑制剂及许多药物前体<sup>[6]</sup>。*slc15a1* mRNA 编码的蛋白质在胞外具有多个糖基化位点, 亲水环和胞外环之间分别穿插着一个蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和一个蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的磷酸化位点, 可产生可逆的磷酸化反应来调节转运功能的基因<sup>[7]</sup>。此外, *slc15a1* 还可激活 NOD 受体依赖性信号通路, 并通过介导 Tri-DAP 和 MDP 转运导致促炎因子的释放, 使得促炎因子诱导多种炎症细胞因子基因的转录, 引起机体免疫应答<sup>[8]</sup>。在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的研究中, *slc15a1* 在抗病毒和抗菌免疫应答中起重要作用<sup>[9]</sup>, 并通过与 USP18 的共表达显著提高 GlyGly (Glycine-Glycine) 转运速率, 上调自身活性。

2003 年 VERRI 等<sup>[10]</sup>在斑马鱼 (*Danio rerio*) 体内发现了 *slc15a1*。随后, 不少学者也在泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)<sup>[11]</sup>、欧洲黑鲈

收稿日期: 2021-01-30 修回日期: 2021-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(31801032); 河南省科技攻关项目(182102210081)

作者简介: 姜 洲(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类系统发育基因组学。E-mail: jz491154021@foxmail.com

通信作者: 董传举, E-mail: cjd1989@126.com

(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[12]</sup>、大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[13]</sup>、鲤<sup>[14]</sup>、鳊 (*Siniperca chuatsi*)<sup>[15]</sup>、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[16]</sup> 等物种体内陆续发现了该基因。在大西洋鲑的研究中, *slc15a1a* 与 *slc15a1b* 具有相同的表达模式,但在机体转运动力、底物特异性和运输效率以及基因的表达水平上均有所不同<sup>[13]</sup>。在斑马鱼中, *slc15a1a* 与 *slc15a1b* 能够共同表达,在促进机体早期发育阶段对二/三肽的摄取中发挥功能<sup>[17]</sup>。在罗非鱼的研究中,当受到高盐度胁迫时 *slc15a1a* 与 *slc15a1b* 具有相似的组织表达趋势,表明该基因对机体的盐度耐受性具有一定影响<sup>[18]</sup>。

鲤是鲤科鱼类中最具代表性的鱼类之一,在全球淡水养殖产业中占有很高比重,具有重要的商业价值<sup>[19]</sup>。另外,鲤作为一种重要模式物种,被广泛应用于发育生物学、免疫学、环境毒理学、生理学及进化基因组学等领域的研究<sup>[20-21]</sup>。近年来,养殖范围和密度急剧增加,导致疾病大肆暴发,例如:嗜水气单胞菌在水中快速传播,并在没有早期预防和及时抢救的情况下导致高死亡率,严重阻碍了水产养殖业的快速发展。关于鲤 *slc15a1* 的研究较少,闫潇<sup>[22]</sup>发现鲤 *slc15a1* 基因在肠道中对小肽的吸收绝大部分在前肠和中肠完成,被肠道吸收后未水解的小肽主要经血液运输到其他组织进行代谢。但近年来研究<sup>[2]</sup>发现, *slc15a1* 基因在鲤感染性疾病及炎症反应中具有一定的调控作用,可能作为疾病治疗的靶点。

目前,对于鲤 *slc15a1* 的大部分研究主要集中于 mRNA 水平上,而在蛋白表达水平上的研究

较少,因此开展对 *slc15a1* 基因的蛋白表达以及功能方面的研究具有一定的理论和现实意义。笔者通过原核表达技术成功获得包含抗原决定簇的鲤 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 目的蛋白,对其进行纯化后免疫小鼠,获得相应的多克隆抗体,采用 ELISA 法检测抗体效价并检测经嗜水气单胞菌感染后鲤血清中 Slc15a1a 和 Slc15a1b 蛋白的表达情况,为更深入研究 *slc15a1* 基因鱼类免疫反应调控机制提供一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

体质量为 (35.0 ± 1.5) g 的实验用鲤取自河南师范大学水产基地,驯养 2 周后随机挑取 3 尾,在无菌条件下取其 12 个组织(心脏、肝脏、脾脏、头肾、肾脏、肌肉、皮肤、血液、性腺、大脑、鳃、肠)均等混样后,提取总 RNA 并检测质量。按照 cDNA 反转录试剂盒 (TaKaRa) 说明书获得第一链 cDNA,用于后续 PCR 扩增模板。

### 1.2 重组表达质粒的构建及鉴定

根据 NCBI 上 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 的氨基酸序列,在 DNASTAR 软件中进行 Protein 分析及抗原决定簇区域的预测,用 Primer 5.0 设计相应的特异性引物(表 1),并添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 特定的酶切位点和保护碱基。对目的片段进行 PCR 扩增(扩增条件:95 °C 5 min;32 个循环包括 95 °C 30 s,57/60 °C 30 s,72 °C 60 s;72 °C 10 min 和 4 °C 保存)。

表 1 引物序列及相关信息

Tab. 1 Primer sequence and related information

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	内切酶 Restriction enzyme	表达载体 Expression vector	感受态细胞 Competent cells	序列号 GenBank
<i>slc15a1a</i>	CGGGATCCGCCATTAGGTTTGTA	<i>Bam</i> H I	pET32a	BL21 (DE3)	MN447397
	CC AAGCTTGACCGAGTTGGGCTTC	<i>Hind</i> III	pET32a	BL21 (DE3)	
<i>slc15a1b</i>	CGGGATCCCGTTTGTGTTTCCTGG	<i>Bam</i> H I	pET32a	BL21 (DE3)	MN447400
	CC AAGCTTGTGGTAACACTGAAGTAG	<i>Hind</i> III	pET32a	BL21 (DE3)	

将目的片段和表达载体 pET-32a(+)用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切(酶切体系:底物 10 μL, *Bam*H I 1 μL, *Hind* III 1 μL, 10 × Buffer 2.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL;酶切条件:37 °C 酶切 3 h),对酶切片段胶回收后连接[反应体

系:目的基因酶切产物 6 μL, pET-32a(+)酶切产物 2 μL, 10 × T4 ligase buffer 1 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, 16 °C 连接 8 h]。重组表达质粒构建后进行 DH5α 转化,按照质粒抽提试剂盒(上海生工)说明书对扩大培养菌体进行质粒提取,并对

质粒进行测序(上海生工)验证。

### 1.3 融合蛋白的原核表达及纯化

将测序正确的重组表达质粒 pET32a-Slc15a1a 和 pET32a-Slc15a1b 转化至感受态 BL21 (DE3),筛选阳性表达菌株,并接种于含氨苄青霉素(ampicillin, Amp, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 300 mL 液体 LB 培养基中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的培养条件下,至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.5~0.6 时,加入 IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导剂,振荡诱导 5 h。采用 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达情况,以未经 IPTG 诱导的菌体样品为对照。分析目的蛋白表达无误后,离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 8 000g, 10 min)收集菌体,加入适量变性结合缓冲液(20 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、15 mmol/L C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>、500 mmol/L NaCl、6 mol/L CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, pH 7.4)重悬后超声波破碎(超声 3 s, 间隔 3 s; 功率 50%; 破碎时间 30 min),离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 8 000g, 30 min)后收集上清液。再将上清液加入 His Trap HP 柱中,参照 His Trap HP 镍柱蛋白纯化操作步骤。在变性条件下纯化表达的融合蛋白,SDS-PAGE 电泳检测纯化蛋白的浓度及纯度。

### 1.4 多克隆抗体的制备

经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(博迈德生物公司)检测纯化后的蛋白质浓度,每个基因用 6 只体质量为(17 $\pm$ 2)g 的 4 周龄小鼠作为免疫动物,其中 3 只小鼠每次注射等量的 1 $\times$  PBS 作为对照组。抗原涡旋乳化后,对小鼠腹腔进行注射。初次免疫使用弗氏完全佐剂(Sigma),后续加强免疫使用弗氏不完全佐剂进行配合注射,单次每只小鼠腹腔注射量为 100  $\mu\text{L}$  蛋白溶液+100  $\mu\text{L}$  弗氏完全/不完全佐剂。间隔 1 周加强免疫 1 次,共免疫 4 次后收集小鼠血清,-80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

采用 ELISA 方法进行抗体效价检测。使用碳酸盐缓冲液(pH 9.6, 0.05 mol/L)将纯化透析后的目的蛋白溶液稀释至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 包被液作空白对照组,加入酶标板 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜;次日 PBST 洗涤 3 次;封闭液封闭(37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 h)后等量加入等梯度稀释[1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:(3 $\times$ 10<sup>4</sup>)、1:(9 $\times$ 10<sup>4</sup>)、1:(2.7 $\times$ 10<sup>5</sup>)、1:(8.1 $\times$ 10<sup>5</sup>)、1:(2.4 $\times$ 10<sup>6</sup>)]血清、阴性对照(未免疫小鼠)血清及空白对照鼠血清稀释液,每个梯度 3 个重复。孵育 2 h(37  $^{\circ}\text{C}$ ),PBST 洗涤 3 次;加入稀释后的 HRP 标

记的羊抗鼠 IgG(1:1 000)37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;TMB 溶液 37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 30 min 后,加入 50  $\mu\text{L}$  硫酸溶液终止反应后测定 A<sub>450</sub>。以处理组/阴性对照的光吸收比值 $\geq$ 2 作为抗体效价判定标准。血清效价检测达标后,分装放于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.5 攻毒试验

实验鲤被随机分配到 100 L 的鱼缸中,分为 2 组(正常组和攻毒组),每组设 3 个重复,每个重复放养 50 尾鲤。每组每天投喂 3 次,投饲率为体质量的 3%。水温(26 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ , pH 7.0 $\pm$ 0.5, 氨氮浓度<0.01 mg/L, DO 浓度>5 mg/L。经过 1 周喂养后,试验组鱼体腹腔注射 150  $\mu\text{L}$  嗜水气单胞菌(LD<sub>50</sub>=1.47 $\times$ 10<sup>6</sup> cfu/mL),对照组注射等量的灭菌 PBS(0.8% NaCl、0.02% KCl、0.027% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.358% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, pH 7.4)。选取注射后的 3、6、9、12、24 和 48 h 进行尾静脉取血,4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜后离心收集血清,放入 1.5 mL 无 RNA 酶管中,-80  $^{\circ}\text{C}$  保存,用于相应指标的测定。

### 1.6 鲤血清中 Slc15a1a 和 Slc15a1b 的表达量测定

将收集的正常组和攻毒组血清用 2 $\times$  包被液等比稀释加入酶标板,4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜后,采用 ELISA 法检测血清中 Slc15a1a 和 Slc15a1b 的表达量。除一抗孵育时,将血清按 1:10 000 稀释混匀后加入酶标板,其他处理均与 1.4 节中的检测方法一致。

### 1.7 数据分析

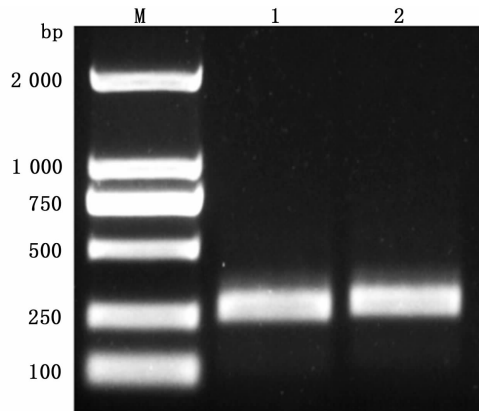
使用 Excel 2019 分析处理酶标仪实验数据;所有数据均用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示。采用 SPSS 19.0 统计软件包进行单因素方差分析及 Duncan 氏法进行多重比较,以判断各实验组之间差异是否显著。

## 2 结果

### 2.1 重组载体的构建与鉴定

将含有酶切位点的特异引物进行 RT-PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,显示在约 300 bp 处分别可见两条特异性目的条带(实际大小分别为 258 bp 和 306 bp),见图 1。使用 BamH I 和 Hind III 对目的片段和质粒 pET-32a(+)进行双酶切,之后分别将 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 基因连

接到 *pET-32a(+)* 载体上(图2),并转化至 *DH5 $\alpha$* ,选取阳性菌落进行测序,并与 NCBI 原始序列进行比对,结果显示重组质粒 *pET32a-Slc15a1a* 和 *pET32a-Slc15a1b* 读码框正确,未出现无碱基突变和移码等问题,证明 *pET32a-Slc15a1a* 和 *pET32a-Slc15a1b* 重组表达载体构建成功。

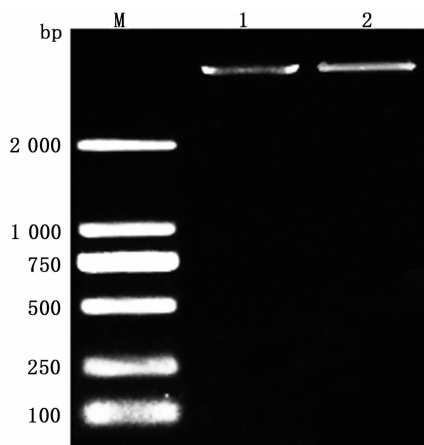


M. 标准物质 2 000; 1. *slc15a1a* 基因 PCR 扩增产物; 2. *slc15a1b* 基因 PCR 扩增产物。

M. Marker 2 000; 1. *slc15a1a* gene PCR amplification product; 2. *slc15a1b* gene PCR amplification product.

图1 PCR产物凝胶电泳分析

Fig.1 Gel electrophoresis analysis of PCR product



M. 标准物质 2 000; 1. *slc15a1a* 基因双酶切验证; 2. *slc15a1b* 基因双酶切验证。

M. Marker 2 000; 1. *slc15a1a* gene double enzyme digestion validation; 2. *slc15a1b* gene double enzyme digestion validation.

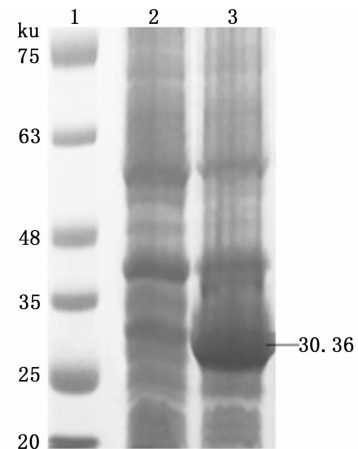
图2 重组表达质粒的双酶切验证

Fig.2 Double enzyme digestion of recombinant expression plasmid

## 2.2 融合蛋白的表达及纯化

将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)表

达菌株中,经 37 °C 振荡培养至 OD 为 0.55 时,加入 IPTG 诱导 5 h,取菌液进行 10% 的 SDS-PAGE 验证。在相对分子质量约为 30 ku 处分别可见 2 条明显的特异性目的条带,与理论值 30.36 ku 和 32.12 ku 相符(图3和图4),表明 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 在原核表达载体 *pET-32a(+)* 中得到了表达。离心收集菌体,加入适量变性结合缓冲液重悬后进行超声破碎。再收集上清液,参照 His Trap HP 镍柱蛋白纯化操作步骤进行纯化,并通过透析袋法去除溶液中的有害元素。经 SDS-PAGE 检测结果显示,与无 IPTG 诱导的阴性对照组和加入 IPTG 诱导的阳性对照组相比,经过多次不同梯度的变性结合缓冲液纯化后的融合蛋白溶液中杂蛋白的含量显著减少(图5和图6)。



1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. 未经 IPTG 诱导的合成组; 3. 经 IPTG 诱导的合成组。

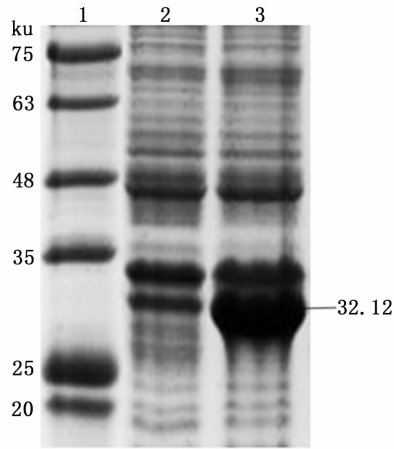
1. Protein marker; 2. Inducement group without IPTG; 3. Inducement group induced by IPTG group.

图3 *Slc15a1a* 融合蛋白的原核表达

Fig.3 Prokaryotic expression of *Slc15a1a* fusion proteins

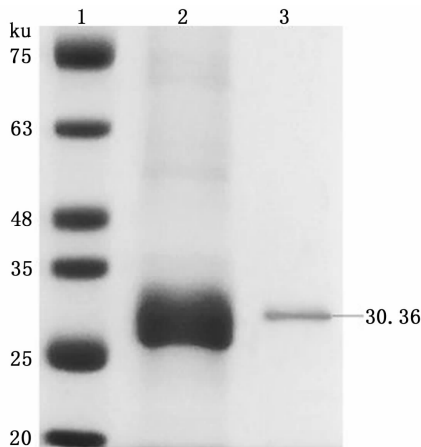
## 2.3 抗血清效价测定

利用纯化透析后的 *Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 融合蛋白,对 4 周龄小鼠进行免疫,采用 ELISA 法检测收集的血清中多克隆抗体的效价。由表 2 和表 3 可以得出,小鼠的抗血清分别稀释至  $8.1 \times 10^5$  (表 2) 和  $2.7 \times 10^5$  (表 3) 时,阳性血清效价与阴性血清效价检测值相比仍大于 2。因此,判定 *Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 多克隆抗体效价分别约为  $8.1 \times 10^5$  和  $2.7 \times 10^5$ ,可用于后续实验中的指标检测。



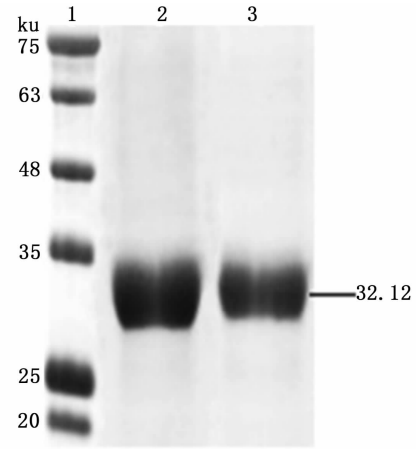
1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. 未经 IPTG 诱导的合成组; 3. 经 IPTG 诱导的合成组。  
1. Protein marker; 2. Inducement group without IPTG; 3. Inducement group induced by IPTG group.

图 4 *Slc15a1b* 融合蛋白的原核表达  
Fig. 4 Prokaryotic expression of *Slc15a1b* fusion proteins



1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. 纯化后蛋白; 3. 透析后蛋白。  
1. Protein marker; 2. Purified protein; 3. Postdialysis protein.

图 5 *Slc15a1a* 融合蛋白的纯化  
Fig. 5 Purification of *Slc15a1a* fusion protein



1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. 纯化后蛋白; 3. 透析后蛋白。  
1. Protein marker; 2. Purified protein; 3. Postdialysis protein.

图 6 *Slc15a1b* 融合蛋白的纯化  
Fig. 6 Purification of *Slc15a1b* fusion protein

2.4 攻毒后血清中基因表达量测定

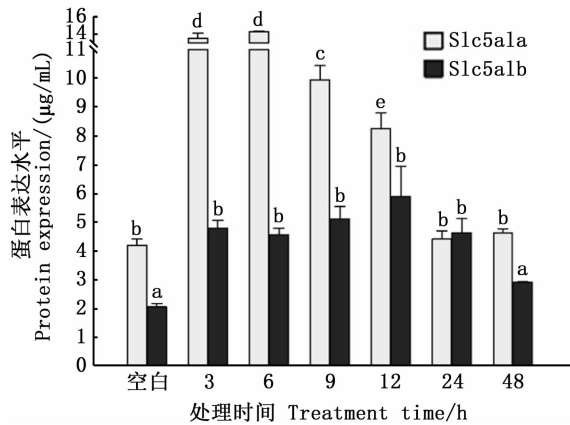
为深入了解鲤 *Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 的蛋白表达水平,用 1 × PBS 或嗜水气单胞菌对鲤腹腔注射后,在 3、6、9、12、24 和 48 h 通过尾静脉取血,以检测血液中指标表达量(图 7)。结果显示与正常组相比,在感染嗜水气单胞菌后,*Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 的表达水平均显著增加。*Slc15a1a* 在 3 h 和 6 h 维持一段时间的高表达水平后开始出现显著性下降直至 24 h 恢复到正常水平。与 *Slc15a1a* 相比,在感染后 *Slc15a1b* 从 3h 至 24 h 就一直维持着较高的相同表达水平,直至 48 h 出现显著性下降,并且在大部分感染时期 *Slc15a1a* 的表达量高于 *Slc15a1b*。在嗜水气单胞菌感染后,*Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 的最高蛋白表达水平与正常对照组相比,其表达量分别增加了 3.39 和 2.85 倍,说明本实验制备的抗体具有较高的亲和力和特异性。

表 2 ELISA 方法测定多克隆抗体 *Slc15a1a* 效价  
Tab. 2 Detection of *Slc15a1a* polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 Item	稀释梯度 Dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 Dilution ratio	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^6$
处理组 Treatment	0.995	0.725	0.621	0.522	0.395	0.261	0.139	0.079
阴性对照组 Negative control	0.193	0.081	0.079	0.077	0.071	0.067	0.059	0.055
空白对照组 Blank control	0.053	0.053	0.051	0.052	0.051	0.051	0.050	0.051
处理组/阴性对照组 Treatment/negative control	5.156	8.951	7.861	6.779	5.563	3.896	2.356	1.436

表3 ELISA 方法测定多克隆抗体 Slc15a1b 效价  
Tab.3 Detection of Slc15a1b polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 Item	稀释梯度 Dilution gradient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数 Dilution ratio	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^6$
处理组 Treatment	0.927	0.699	0.622	0.527	0.335	0.171	0.108	0.094
阴性对照组 Negative control	0.153	0.079	0.073	0.071	0.070	0.061	0.059	0.055
空白对照组 Blank control	0.053	0.051	0.050	0.051	0.050	0.051	0.051	0.050
处理组/阴性对照组 Treatment/negative control	6.059	8.848	8.521	7.423	4.786	2.803	1.831	1.709



图中不同小写字母 (a, b, c, d, e) 表示不同处理组间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters (a, b, c, d, e) indicate significant differences among different groups treatment ( $P < 0.05$ ).

图7 血清中 Slc15a1a 和 Slc15a1b 蛋白质表达水平的检测

Fig.7 Detection of Slc15a1a and Slc15a1b protein expression level in serum

### 3 讨论

*slc15a1* 基因是一种主要存在于小肠上皮细胞的质子依赖型转运蛋白,作用底物对动物体内的蛋白质吸收具有重要作用。在斑马鱼的研究中,*slc15a1* 会对 Met-Lys 和 Lys-Met 表现出较高的亲和力和出色的转运效率,转运速度加快<sup>[23]</sup>。大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 体内的小肽转运载体表达也会受肠腔内不同蛋白源的影响,当肠腔内存在大量富含低分子量肽段时会上调 *slc15a1* mRNA 的表达量<sup>[24]</sup>。在草鱼的研究中,饲料的蛋白水平对 *slc15a1* 基因表达有重大影响,且 *slc15a1* mRNA 的表达会受时间和空间的调控<sup>[25]</sup>。但随着研究的不断深入,不少学者发现 *slc15a1* 可以激活机体固有免疫信号转导,引起机体免疫应答<sup>[26]</sup>。在鱼类感染性炎症及相关疾病

中 *slc15a1* 基因也起重要作用<sup>[2]</sup>,当鲤受到嗜水气单胞菌感染时,*slc15a1* 的表达量升高,并在 12 h 达到最高表达值。目前水产动物疾病的免疫防治一直备受关注,高效的多克隆抗体已成为鱼类免疫学的研究热点之一。本试验通过制备 Slc15a1a 和 Slc15a1b 多克隆抗体,对其蛋白水平的免疫调控功能进行了研究。

#### 3.1 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 基因多克隆抗体制备

为了更好地探寻 Slc15a1a 和 Slc15a1b 在免疫上发挥的作用,本试验采用 PCR 技术克隆 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 基因含有部分抗原决定簇的片段,引入双酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind* III 后连接至 pET-32a(+). 表达载体的选择对克隆目的基因及介导目的基因转录和翻译上发挥着重要作用。例如:表达载体的启动子强度、载体活性和融合标签等都会不同程度地影响克隆基因的表达效率<sup>[27]</sup>。蛋白纯化方法的选择在多克隆抗体制备的过程中至关重要,本研究在包涵体的纯化过程中,采用 His 柱单独纯化法,并选用尿素变性结合缓冲液作为变性剂,其优点是具有非离子化、呈中性、低成本等,而且复性后的蛋白不会出现大量物质沉淀。因此,当蛋白质加入 His 柱中开始纯化时,以低浓度到高浓度的尿素变性结合缓冲液进行梯度洗脱,从而实现了对杂蛋白的线性逐步脱除。而在复性的过程中采用透析复性法,可以为重折叠蛋白提供优质的环境,使蛋白的产量得以增加并过滤有害元素<sup>[28]</sup>。与阳性对照组相比,纯化透析后的融合蛋白溶液中且杂蛋白含量显著减少。

#### 3.2 嗜水气单胞菌感染对鲤 *slc15a1* 基因表达量的影响

*slc15a1* 可与 NOD 受体结合,激活 NF-KB 和 MAPK 信号通路,从而导致下游促炎因子和趋化因子的生成,以及嗜中性粒细胞向炎症区域的浸

润<sup>[29]</sup>。细菌也可以通过相关途径到达含有 *slc15a1* 表达的固有层巨噬细胞中,从而引起机体炎症反应<sup>[30]</sup>。嗜水气单胞菌常被用于检测机体免疫功能试验。在感染嗜水气单胞菌后,团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 体内的非特异性免疫反应及铁代谢调节机制被激活,各时间点肝脏中 IL-6 的表达量均有所上升<sup>[31]</sup>;齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 在感染嗜水气单胞菌后,机体的免疫调节机制迅速做出响应,血液中的 *sqhmgbi* 基因在 0.5 ~ 72 h 快速上调<sup>[32]</sup>。而本实验鲤在感染嗜水气单胞菌后, *Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 的表达水平快速上升, *Slc15a1a* 在 3 h 和 6 h 具有相同的高表达水平。与 *Slc15a1a* 相比,在感染后 *Slc15a1b* 从 3 至 24 h 一直维持着较高的相同表达水平,直至 48 h 出现显著性下降。与空白对照相比,感染后 *Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 的蛋白表达最高水平表达量分别增加了 3.39 和 2.85 倍。这可能说明 *Slc15a1a* 和 *Slc15a1b* 具有较强的免疫原性,能够及时地诱导机体产生免疫应答。

### 3.3 鲤 *slc15a1a* 和 *slc15a1b* 基因的表达差异

全基因组复制事件后进化的主要驱动力是基因丢失、表达差异以及功能分化<sup>[33]</sup>,但基因功能分化缓慢,而表达差异较为强烈。例如:斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 受到斑点叉尾鲷呼肠孤病毒 (channel catfish hemorrhage reovirus, CCRV) 感染 12 h 的脾脏中, *TLR5* 基因的表达量仅为对照组的 1.7%,而 *TLR5S* 基因表达量仅为对照组的 1.0%,两个拷贝基因之间表达差异明显<sup>[34]</sup>。当受到嗜水气单胞菌或斑点叉尾鲷呼肠孤病毒侵染时,草鱼 *IL-12p30* 和 *IL-12p40* 两个拷贝间也具有较大的表达差异<sup>[35]</sup>。对鲤 1 757 对重复基因的研究中,大多数的重复基因在选择压力下都是保守的,在同一个组织中可共表达的重复基因对占 92.5%,但其中近一半的基因表达不再高度相关,约有 25% 的基因对开始出现功能差异<sup>[33]</sup>。而本实验当嗜水气单胞菌感染时, *Slc15a1a* 在感染后 3 h 和 6 h 迅速做出高表达量响应,在 12 h 后就开始出现表达水平的下降,但 *Slc15a1b* 在 3 ~ 24 h 时却一直维持着稳定的较高表达响应,因此 *slc15a1a* 基因可能是作为 *slc15a1* 基因的主效基因,在免疫应答中发挥作用。在鲤 *IL10a/b*<sup>[36]</sup> 和草鱼 *STAT3a1/2*<sup>[37]</sup> 的研究中也发现

了类似结果。在细菌感染时,鲤 *IL10a/b* 两个蛋白之间具有差异性调节机制和不同作用点,同时 *IL10a* 的高表达可能表明这种蛋白更有助于维持体内平衡。草鱼 *STAT3 $\alpha$ 2* 在草鱼 *STAT3* 功能表达中起主导作用,即草鱼受到免疫刺激时, *STAT3 $\alpha$ 2* 的转录表达水平始终高于 *STAT3 $\alpha$ 1*。因此,在基因复制后,往往一个基因拷贝的表达具有一定优势,发挥主效基因的作用,从而减少了功能表达冗余,避免潜在的适应冲突<sup>[38]</sup>。

### 参考文献:

- [1] VERRI T, TEROVA G, DABROWSKI K, et al. Peptide transport and animal growth: the fish paradigm[J]. *Biology Letters*, 2011, 7(4): 597-600.
- [2] DONG C J, JIANG Z, ZHANG X Y, et al. Phylogeny of *Slc15* family and response to *Aeromonas hydrophila* infection following *Lactococcus lactis* dietary supplementation in *Cyprinus carpio*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 705-714.
- [3] RÉRAT A. Nutritional value of protein hydrolysis products (Oligopeptides and free amino acids) as a consequence of absorption and metabolism kinetics [J]. *Archiv für Tierernährung*, 1995, 48(1/2): 23-26.
- [4] RUBIO-ALIAGA I, DANIEL H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23(9): 434-440.
- [5] WENZEL U, THWAITES D T, DANIEL H. Stereoselective uptake of  $\beta$ -lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter[J]. *British Journal of Pharmacology*, 1995, 116(7): 3021-3027.
- [6] RUBIO-ALIAGA I, DANIEL H. Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition [J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(7/8): 1022-1042.
- [7] 朱宇旌, 王秉玉, 张勇, 等. 小肽转运载体 1 的生物学特性及其功能[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(10): 1847-1853.
- [8] ZHU Y J, WANG B Y, ZHANG Y, et al. Peptide transporter 1: Biological characteristics and functions [J]. *Acta Zoonutrientia Sinica*, 2012, 24(10): 1847-1853.
- [9] LEE J, TATTOLI I, WOJTAL K A, et al. pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(35): 23818-23829.
- [10] WARSJ J, HOSSEINZADEH Z, ELVIRA B, et al. USP18 sensitivity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129365.
- [11] VERRI T, KOTTRA G, ROMANO A, et al. Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter [J]. *FEBS Letters*, 2003,



- 549(1/3): 115-122.
- [11] GONÇALVES A F, CASTRO L F C, PEREIRA-WILSON C, et al. Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish? [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, 2(4): 345-355.
- [12] TEROVA G, CORÀ S, VERRI T, et al. Impact of feed availability on *PepT1* mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 294(3/4): 288-299.
- [13] GOMES A S, VACCA F, CINQUETTI R, et al. Identification and characterization of the Atlantic salmon peptide transporter 1a [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2020, 318(1): C191-C204.
- [14] OSTASZEWSKA T, DABROWSKI K, KAMASZEWSKI M, et al. The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and *PepT1* and *PepT2* expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(2): 158-169.
- [15] 刘知行, 张健东, 刘小燕, 等. 鳃小肽转运载体 *PepT1* 基因分子特征及其表达研究 [J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 556-562.
- LIU Z X, ZHANG J D, LIU X Y, et al. Molecular characterization and expression research of oligopeptide transporter *PepT1* in *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 556-562.
- [16] 冯军厂, 刘臻, 鲁双庆, 等. 草鱼小肽转运载体 *PepT1* 基因的克隆与表达特征 [J]. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 276-285.
- FENG J C, LIU Z, LU S Q, et al. Cloning of the *PepT1* gene and analysis of its expression in *Ctenopharyngodon idellus* tissues [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 276-285.
- [17] VACCA F, BARCA A, GOMES A S, et al. The peptide transporter 1a of the zebrafish *Danio rerio*, an emerging model in nutrigenomics and nutrition research: molecular characterization, functional properties, and expression analysis [J]. *Genes & Nutrition*, 2019, 14: 33.
- [18] CHOURASIA T K, D' COTTA H, BAROILLER J F, et al. Effects of the acclimation to high salinity on intestinal ion and peptide transporters in two tilapia species that differ in their salinity tolerance [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2018, 218: 16-23.
- [19] TAKEUCHI F, OCHIAI Y, SERIZAWA M, et al. Search for type 2 diabetes susceptibility genes on chromosomes 1q, 3q and 12q [J]. *Journal of Human Genetics*, 2008, 53(4): 314-324.
- [20] DONG C J, CHEN L, FENG J Y, et al. Genome wide identification, phylogeny, and expression of *Aquaporin* genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0166160.
- [21] DONG C J, JIANG L K, PENG W Z, et al. Phylogenetic and evolutionary analyses of the frizzled gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) provide insights into gene expansion from whole-genome duplications [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144037.
- [22] 闫潇. 鲤鱼肠道小肽转运载体 *PepT1* 的表达研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2013.
- YAN X. Expression of intestinal peptide transporter *PEPT1* from *Cyprinus carpio* L. [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2013.
- [23] MARGHERITIS E, TEROVA G, OYADEYI A S, et al. Characterization of the transport of lysine-containing dipeptides by *PepT1* orthologs expressed in *Xenopus laevis* oocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 164(3): 520-528.
- [24] 李文杰. 不同氨基酸模式及来源对大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 稚鱼生长、存活、消化酶活力及蛋白质代谢的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- LI W J. Effects of different dietary amino acid patterns and sources on growth, survival activities of digestive enzymes and protein metabolism of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [25] LIU Z, ZHOU Y, FENG J C, et al. Characterization of oligopeptide transporter (*PepT1*) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 164(3): 194-200.
- [26] DALMASSO G, NGUYEN H T T, CHARRIER-HISAMUDDIN L, et al. *PepT1* mediates transport of the proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-DAP in intestinal epithelial cells [J]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 299(3): 687-696.
- [27] BRAUN P, LABAER J. High throughput protein production for functional proteomics [J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(9): 383-388.
- [28] 林娜. 蜂王浆致敏糖蛋白的结构表征及糖胺聚糖对其致敏性影响的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
- LIN N. Structural characterization of royal jelly sensitized glycoprotein and the effect of glycosaminoglycan on its sensitization [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2019.
- [29] WOJTAL K A, ELORANTA J J, HRUZ P, et al. Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2009, 37(9): 1871-1877.
- [30] INGERSOLL S A, AYYADURAI S, CHARANIA M A, et

- al. The role and pathophysiological relevance of membrane transporter *PepTI* in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease [J]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, 302(5): 484-492.
- [31] 杨永波, 扶晓琴, 陈柏湘, 等. 嗜水气单胞菌感染对团头鲂肝脏铁代谢的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34(4): 97-101.
- YANG Y B, FU X Q, CHEN B X, et al. Effect of *Aeromonas hydrophila* infection on iron metabolism in *Megalobrama amblycephala* liver [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2015, 34(4): 97-101.
- [32] 王虹, 彭爽, 刘佳喜, 等. 齐口裂腹鱼 *HMGB1* 基因克隆及其对嗜水气单胞菌胁迫的响应[J]. *水产学报*, 2018, 42(12): 1957-1966.
- WANG H, PENG S, LIU J X, et al. Cloning of *HMGB1* gene from *Schizothorax prenanti* and its response to *Aeromonas hydrophila* stress [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(12): 1957-1966.
- [33] LI J T, HOU G Y, KONG X F, et al. The fate of recent duplicated genes following a fourth-round whole genome duplication in a tetraploid fish, common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 8199.
- [34] 李敏, 李琪, 王启龙, 等. 斑点叉尾鲷 *TLR5* 和 *TLR5S* 基因在不同病原诱导下的表达特征 [J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 30-38.
- LI M, LI Q, WANG Q L, et al. Gene expression of *TLR5* and *TLR5S* in channel catfish *Ictalurus punctatus* induced by different pathogens [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 30-38.
- [35] PANDIT N P, SHEN Y B, XU X Y, et al. Differential expression of interleukin-12 *p35* and *p40* subunits in response to *Aeromonas hydrophila* and *Aquareovirus* infection in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1169-1183.
- [36] PIAZZON M C, WENTZEL A S, WIEGERTJES G F, et al. Carp *Il10a* and *Il10b* exert identical biological activities *in vitro*, but are differentially regulated *in vivo* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 350-360.
- [37] DU L Y, ZHOU H, QIN L, et al. Identification and functional evaluation of two *STAT3* variants in grass carp: Implication for the existence of specific alternative splicing of *STAT3* gene in teleost [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 76: 326-333.
- [38] 董传举, 张江凡, 李胜杰, 等. 鲤和草鱼 *IL17* 受体基因家族的全基因组识别、起源进化及表达分析 [J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 1693-1703.
- DONG C J, ZHANG J F, LI S J, et al. Genome-wide identification, phylogeny, and expression of *IL17* receptor genes in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1693-1703.

## Preparation of polyclonal antibodies to *Cyprinus carpio slc15a1* gene and its expression analysis

JIANG Zhou<sup>1</sup>, ZHANG Meng<sup>1</sup>, LIU Kaiyue<sup>1</sup>, XUE Yaguo<sup>1,2</sup>, SHAO Jiaqi<sup>1,3</sup>, LI Xuejun<sup>1</sup>, DONG Chuanju<sup>1</sup>  
(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xixiang 453007, Henan, China; 2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China; 3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China)

**Abstract:** *Cyprinus carpio slc15a1* gene is a low-affinity, high-volume transporter of small peptides and peptide analogs into various tissue cells using a proton gradient inverse concentration, and this gene also plays an important role in the immune response. To investigate the changes of *slc15a1* (*slc15a1a* and *slc15a1b*) genes in the immune response mechanism in carp at the protein level, the fragments of *slc15a1a* and *slc15a1b* genes containing part of the antigenic determinant cluster were ligated to pET-32a(+) by adding the double digestion sites *Bam*H I and *Hind* III, and the corresponding expression vectors were constructed, and polyclonal antibodies to *slc15a1a* and *slc15a1b* genes were successfully prepared. The potency of the antibody was detected by ELISA, and the potency of mouse anti-Slc15a1a and Slc15a1b obtained were  $8.1 \times 10^5$  and  $2.7 \times 10^5$ . When infected by *Aeromonas hydrophila*, the highest protein expression levels of Slc15a1a and Slc15a1b increased 3.39 and 2.85-fold, respectively, compared with the blank control, indicating that the polyclonal antibodies prepared in this experiment have high affinity and specificity and exhibit strong immunogenicity, which can promptly induce an immune response in the organism. Slc15a1a responded rapidly with high expression at 3 h and 6 h after *A. hydrophila* infection and began to show a decrease in expression level after 12 h, but Slc15a1b maintained a more stable high expression response between 3 h and 24 h, indicating a certain expression difference between Slc15a1a and Slc15a1b. During infection, the expression of Slc15a1a was largely higher than that of Slc15a1b, so the *slc15a1a* gene may be the major gene of the *slc15a1* gene and may play an important role in the common carp immune response process.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; *slc15a1* gene; antibody; *Aeromonas hydrophila*