

田照辉,胡红霞,王巍,等. 西伯利亚鲟 *MHC II β* 克隆、原核表达和多克隆抗体制备[J]. 江苏农业科学,2022,50(20):201–206.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2022.20.030

西伯利亚鲟 *MHC II β* 克隆、原核表达和多克隆抗体制备

田照辉,胡红霞,王巍,东天,孙爱

(北京农林科学院水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心,北京 100068)

摘要:旨在构建西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) *MHC II β* 基因原核表达载体高效表达,并进行多克隆抗体的制备。根据 GenBank 西伯利亚鲟 *MHC II β* 基因序列设计引物,并加上 6-His 标签和酶切位点,从西伯利亚鲟脾脏细胞中克隆可读编码框(不含信号肽)部分,克隆并测序鉴定后构建 Pet30 α -*MHC II β* 质粒,转化至大肠杆菌 BL21(DE3),异丙基硫代半乳糖苷 IPTG 诱导表达,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、免疫印迹(Western Blot)鉴定,诱导表达的融合蛋白大小约为 32 ku,能够与 His 抗体结合,融合蛋白主要以包涵体形式存在,在温度 37℃ 时 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 可以达到最佳表达量。将表达蛋白通过镍柱层析纯化后,制备兔多克隆抗体,抗体效价达到 243 W,为深入研究西伯利亚鲟 *MHC II β* 基因免疫学功能提供参考。

关键词:西伯利亚鲟;*MHC II β* 基因;原核表达;多克隆抗体

中图分类号:S942.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2022)20–0201–05

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) 统称为 MHC 分子,是高度多态的基因群,其编码产物是一类细胞表面转膜蛋白,非常复杂且最具多态性,广泛存在于脊椎动物体内,与免疫功能密切相关^[1–3]。MHC 分子分为 3 类,其 I 类、II 类分子参与抗原呈递过程^[4]。其中 MHC II 类分子是由 α 链和 β 链组成的跨膜糖蛋白,主要在与呈递抗原有关的细胞中表达,如 B 细胞、激活的 T 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞等细胞膜上^[5],主要功能是将外源性抗原呈递给 T 细胞抗原受体 TCR(T cell receptor, TCR)^[6]。在病毒感染过程中,某些病毒蛋白通过干扰 *MHC II* 基因的功能,影响机体正常的免疫识别^[7]。凡是能激活免疫细胞的刺激源,如感染的病原体、抗原以及各种炎症反应,都能刺激局部组织发生 MHC 上调。细胞因子 IFN- γ 可诱发和增强免疫细胞(除 B 细胞外)表达 II 类分子并增强它们的表达;肿瘤坏死因子 TNF- α 系统能上调白细胞介素 4 从而增强 B 细胞表达 II 类分子^[8]。

鱼类 *MHC II* 基因在鱼类机体免疫中发挥着重要作用,淋巴组织和与免疫相关的脾脏、鳃、胃、前

肠是鱼类最易接触病原体的部位,在鱼类处于非抗原攻击状态下,*MHC II* 基因主要在这些器官或组织中表达^[9]。鱼类在对外部生存环境不断适应的长期进化过程中,为了抵御病原的侵入,保护机体内环境的稳态,*MHC II* 基因家族形成了极其丰富的多态性。自 Hashimoto 等于 1990 年首次报道了鲤(*Cyprinus carpio*)的部分 *MHC* 基因序列以来^[10],国内外学者已对鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)^[2]、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[1]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[11]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[12]等许多鱼类的 *MHC II* 类基因进行了研究。

西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)为鲟科鲟属,软骨硬鳞类,是重要的鲟鱼养殖品种和育种材料,具有重要的科研和经济价值,被列为《濒危动植物种国际贸易公约》附录 II 物种^[13]。近年来,随着鲟鱼产业的发展壮大,鲟鱼养殖病害问题也日益增多,严重制约着鲟鱼产业的健康可持续发展^[14]。目前对于鲟鱼 *MHC* 基因的研究主要集中在物种进化方面,对其遗传和免疫相关研究较少,不同鱼类经抗原刺激后其 *MHC II β* 基因表达情况并不一致。本课题组前期进行了西伯利亚鲟 *MHC* 基因的克隆、组织分布和细菌感染后的表达,但对其 MHC 免疫功能还缺乏深入研究^[14]。鉴于 *MHC II β* 基因的重要功能和表达的复杂性,本研究构建了原核高效表达载体,制备了效价高、特异性强的多克隆抗体,为深入研究西伯利亚鲟 *MHC II β* 基因免疫学功能奠定基础。

收稿日期:2021–11–04

基金项目:现代农业产业技术体系北京市鲟鱼、鲑鳟鱼创新团队项目(编号:BAIC08–2018)。

作者简介:田照辉(1973—),女,河北保定人,硕士,副研究员,主要从事水产健康养殖方面的研究。E-mail:tzhhui@126.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料和主要试剂

1.1.1 菌株、质粒和试验动物 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态为 TIANGEN 公司产品, DH5 α 感受态由本实验室制备保存; 克隆质粒 pGEM - T Vector 购于 Promega 公司, 为氨苄抗性; 表达质粒 Pet30 α 由北京市水产科学研究所水族研究室保存提供, 为卡那霉素抗性, 并带有 6 - His 标签。西伯利亚鲟由北京市水产科学研究所鲟鱼良种场提供。

1.1.2 主要工具酶及试剂 RNA 提取和 RNase - Free DNase Set 试剂盒 (Qiagen 公司), RT 反转录试剂盒、6X His 标签 Tag 抗体、辣根酶二抗 (中杉金桥公司), 彩虹预染宽分子量蛋白 Marker (北京宝如亿生物公司), 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、ExTaq DNA 聚合酶、Ryrobust DNA 保真酶、DNA Marker (DL2000、DL10000)、T₄ DNA 连接酶 (Takara 公司), 双酶切所用酶 *Nco* I、*Xho* I (NEB 公司)。其他常规化学试剂均为化学优级纯级。引物合成及序列测定由北京擎科生物工程有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 试验于 2018 年开始在北京市水产科学研究所陆续开展, 首先在 GenBank 数据库查找西伯利亚鲟 *MHC II* β 基因序列 (登录号: JQ288773), 参照质粒载体 Pet30 α 序列的酶切位点, 用 Primer 5.0 软件分析西伯利亚鲟 *MHC II* β 基因酶切位点, 并根据 mRNA 序列设计引物, 扩增可读编码框除信号肽序列的 699 bp, 上游引物 MHC - E - F: catgccatggctGTTCGACGGTACTTGATG, 下游引物 MHC - E - R: cgcctcgagTTAATCTGATGGCACCA, 并在上、下游引物的 5' 端分别引入 *Nco* I、*Xho* I 酶切位点 (单下划线) 和保护碱基 (双下划线), 引入酶切位点和保护碱基后扩增片段为 720 bp。

1.2.2 基因扩增和构建克隆质粒 T - *MHC II* β 试验用西伯利亚鲟鱼由北京市水产科学研究所国家级鲟鱼良种场提供。取西伯利亚鲟脾脏组织, 参照 Qiagen 总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 反转录为 cDNA。以脾脏 cDNA 为模板, 利用引物 MHC - E - F 和 MHC - E - R 扩增 *MHC II* β 目的片段, PCR 产物经电泳检测, 胶回收试剂盒纯化后, 连接于 pGEM - T 质粒载体, 转化大肠杆菌克隆菌株 DH5 α , 进行蓝白斑筛选, 鉴定阳性的菌液由北京擎科生物工程有限公司测序, 测序结果和参考序列比

对, 比对成功的菌液提质粒 T - *MHC II* β 。

1.2.3 构建重组表达质粒 Pet30 α - *MHC II* β 以 T - *MHC II* β 质粒为模板, 使用引物 MHC - E - F、MHC - E - R 和保真酶扩增 *MHC II* β 目的片段, 胶回收纯化产物和质粒 Pet30 α 分别作为底物进行 *Nco* I 和 *Xho* I 酶双酶切: 37 °C 2 h, 80 °C 20 min, 酶切产物胶回收纯化后, 将酶切后的质粒 Pet30 α 和 *MHC II* β 目的片段连接。连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 在含有卡那霉素 (Kan) 的选择性培养基上筛选阳性克隆, 进行 PCR 菌液鉴定, 阳性克隆交由北京擎科生物工程有限公司送检测序, 经序列比对后, 选取测序正确的菌液, 提取质粒 Pet30 α - *MHC II* β , 转化到表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 在含卡那霉素 (Kana) 的选择性培养基上筛选阳性克隆, 接种到 LB (Kana⁺) 液体培养基过夜培养, 再次进行 PCR 菌液鉴定测序, 测序正确的菌液用甘油保存于 -80 °C 备用, 用于原核表达研究。将 Pet30 α 空质粒转化到表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中为对照组。

1.2.4 Pet30 α - *MHC II* β 在大肠杆菌中的原核表达和鉴定 将保存的构建好的表达菌株复苏, 挑选单克隆接种于 LB (kana⁺) 培养基, 37 °C 180 r/min 振荡过夜。取过夜培养的菌液 2 mL 接种于 200 mL 液体 LB (kana⁺) 培养基中, 37 °C 180 r/min 振荡至 $D_{600\text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$ 时, 加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 不加 IPTG 的培养管作为对照组, 37 °C 180 r/min 培养 6 h 收集菌液暂存于 4 °C 冰箱备用。取 1 mL 表达菌液 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 200 μ L PBS 重悬菌液, 加 loading buffer 混匀后煮沸 5 min, 再次离心后使用 SDS - PAGE、Western Blot 检测表达蛋白。

1.2.5 蛋白质存在性质的鉴定 取 100 mL 诱导的培养物, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 25 mL 的 PBST 缓冲液, 冰浴 10 min 后超声 13 min。取裂解物 1 mL, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 分离上清, 沉淀直接制备电泳样品。往上清中加入 1/10 体积的三氯醋酸 TCA 混匀, 振荡 15 s, 置冰上放置至少 15 min, 然后 14 000 g (13 770 r/min) 离心 10 min, 去上清, 加入 100 μ L 丙酮混合, 14 000 g 离心 5 min 洗沉淀 2 次, 从沉淀中去除丙酮, 风干沉淀 (将盖子打开至少 60 min)。往菌体超声裂解的沉淀物及 TCA 沉淀的蛋白中加入 100 μ L PBS 和 100 μ L SDS 上样缓冲液振荡混合, 置于沸水中加热 5 min, 再次离心后进行 SDS - PAGE 电泳和 Western

Blot 鉴定。

1.2.6 最适表达时间和最适表达温度 取含有融合质粒 Pet30 α - *MHC II* β 过夜培养的单克隆菌液,以 1% 的比例接种于 200 mL 的 LB (Kana⁺) 培养基中,当 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.4 ~ 0.6 时,加入 1 mmol/L 的 IPTG,180 r/min 37 °C 分别诱导 2、4、6、8 h,同时设置 180 r/min 27 °C 诱导 8 h 作为温度对照组及不加 IPTG 的对照组和 Pet30 α 空质粒对照组。

1.2.7 镍柱层析纯化表达蛋白 收集破碎后的菌体,用含有 8 mol/L 尿素的 BufferA 溶解包涵体,12 000 r/min 离心 20 min,取菌体上清,用 BufferA + 8 mol/L 尿素平衡镍柱,加入包涵体裂解上清,过柱,洗去非特异性结合,洗脱镍柱上结合的重组蛋白,SDS - PAGE 电泳鉴定浓缩的重组蛋白(图)。采用 10 ku 的超滤管对蛋白进行浓缩,到终体积为 2 mL, -80 °C 保存。

1.2.8 多克隆抗体制备及检测 以纯化重组蛋白为免疫原,免疫 2 只新西兰大白兔,抗原浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,注射剂量为 100 $\mu\text{g/只}$,腿部肌肉皮下多点注射。共免疫 9 次,每次间隔 15 d,从第 3 次免疫开始,每次免疫 7 d 后采血检测抗体效价,第 7 次采血得到抗体后,进行了采全血与纯化及纯化后的 ELISA、SDS - PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 扩增得到用于蛋白表达的基因序列

以提取的总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,

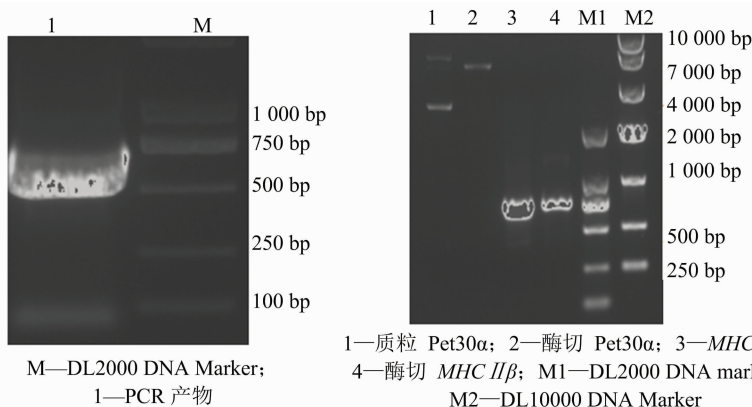


图1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳 图2 酶切 Pet30 α 和 *MHC II* β 琼脂糖凝胶电泳

以 MHC - E - F 和 MHC - E - R 引物进行 PCR 扩增,产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,可见约 720 bp 的扩增片段,与预期大小相符(图 1)。扩增片段测序结果与参考基因序列比对,没有插入、缺失和移码突变,可用于构建原核融合表达质粒。

2.2 构建重组质粒 Pet30 α - *MHC II* β

以 T - *MHC II* β 质粒为模板使用保真酶扩增的 *MHC II* β 胶回收产物、Pet30 α 质粒进行 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切,酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2,酶切后的 Pet30 α 在 5 400 bp 处、*MHC II* β 在 720 bp 处有目的片段,酶切成功后,用 T₄ 连接酶连接构建 Pet30 α - *MHC II* β 质粒,转化 *E. coli* BL21 (DE3) 后,进行菌液鉴定,阳性克隆再次送检测序,测序正确的菌株用于蛋白表达。

2.3 重组蛋白的理化性质预测

软件分析表明,Pet30 α - *MHC II* β 重组蛋白含 837 bp 碱基,编码 237 个氨基酸,蛋白分子量为 31 287.40 u,包括 31 个强碱性氨基酸(K,R),39 个强酸性氨基酸(D,E),81 个疏水氨基酸(A,I,L,F,w,V),71 个极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y);等电点 6.211,在 pH 值 7.0 时带 5.889 电荷;蛋白序列含有 6 个组氨酸融合标签,便于免疫印迹鉴定和蛋白纯化。利用在线工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> 预测,表达蛋白具有 6 个糖基化位点(阈值为 0.5,附加阈值为 0.32、0.75、0.90)(图 3)。

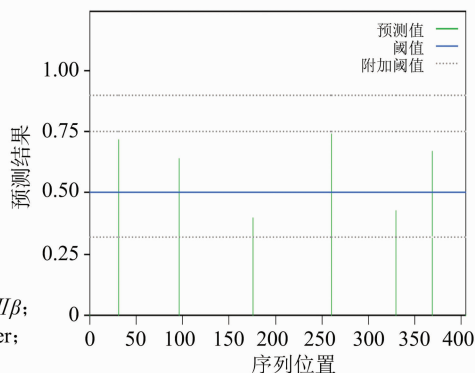


图3 预测的糖基化位点

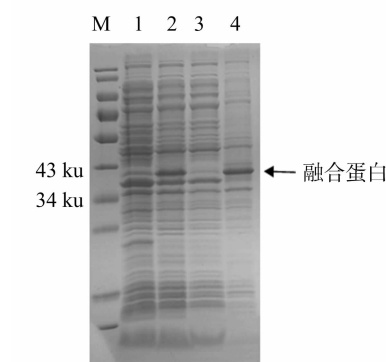
2.4 Pet30 α - *MHC II* β 在大肠杆菌中的表达

含重组质粒 Pet30 α - *MHC II* β 的大肠菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导培养后,将菌液收集进行 SDS - PAGE 电泳,可见大小约为 36 ku 的浓染蛋白带,用 DNASTAR 预测 Pet30 α - *MHC II* β 表达的融合蛋白大

小为 32 ku,与彩虹预染蛋白 Marker 指示的 36 ku 大小略有差异,但基本相符,对表达的融合蛋白进行免疫印迹检测,Western Blot 检测结果阳性说明该蛋白是目的蛋白。将菌液超声波裂解后的上清和沉淀中的蛋白进行 SDS - PAGE 电泳(图 4),对表达的蛋

白进行免疫印迹检测(图 5),可见沉淀中的浓染蛋白含量大于上清中的浓染蛋白量,可知该融合蛋白为包涵体蛋白。

将不同表达时间和表达温度培养的菌液收集处理后进行 SDS - PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,1 mmol/L IPTG 诱导 2、4、6、8 h 均可检测到明显的浓染蛋白带,未加 IPTG 诱导检测到较低含量的蛋



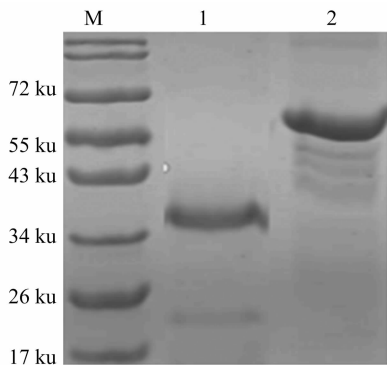
M—蛋白 Marker; 1—诱导前; 2—全菌蛋白; 3—上清蛋白; 4—沉淀蛋白

图4 重组融合蛋白MHC II β 的

SDS—PAGE 检测

2.5 蛋白表达纯化

纯化浓缩后的蛋白含量为 1 mg/mL, SDS - PAGE 电泳检测浓缩的重组蛋白(图 7),在 36 ku 处有较浓的条带。



M—蛋白 Marker; 1—重组蛋白; 2—牛血清白蛋白

图7 纯化的重组蛋白 SDS—PAGE 电泳

2.6 多克隆抗体

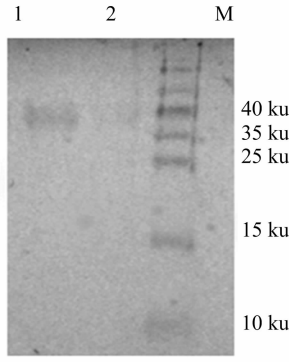
免疫后大白兔的血清样品经过离心,过柱,得到的抗体进行超滤处理,纯化后的抗体 ELISA 检测抗体效价为 240 W, SDS - PAGE 电泳(图 8)、Western Blot 显示,纯化的抗体可与抗原特异性结合。

3 讨论

3.1 引物设计和基因扩增

脾脏是重要的免疫器官^[13],硬骨鱼类受到外

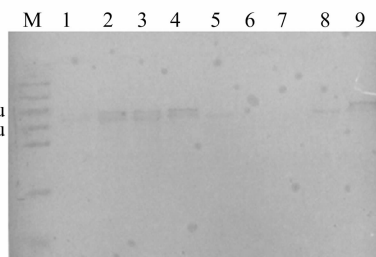
白条带,未加 IPTG 和加 IPTG 诱导的 Pet30 α 空质粒对照均无蛋白条带(图 6)。用伯乐凝胶成像 Image Lab 进行条带灰度分析:诱导 4 h 蛋白表达量最高;在 27 $^{\circ}$ C 诱导 8 h 的蛋白条浓度低于相同条件 37 $^{\circ}$ C 诱导的蛋白浓度。Western Blot 显示融合蛋白条带清晰特异性强。



M—蛋白 Marker; 1—沉淀蛋白;

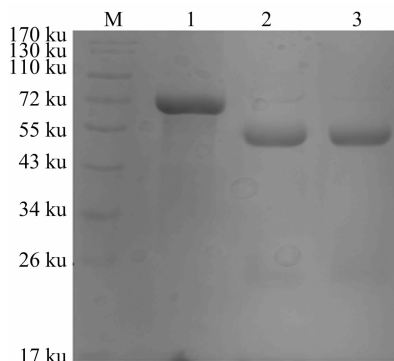
2—上清蛋白

图5 蛋白存在性质的 Western Blot 检测



M—蛋白 Marker; 1、2、3、4—37 $^{\circ}$ C 时 IPTG 诱导 2、4、6、8 h; 5—37 $^{\circ}$ C 时没有 IPTG 诱导的对照组 8 h; 6—Pet30 α 空质粒菌株 IPTG 诱导 8 h; 7—Pet30 α 空质粒菌株未加 IPTG 诱导 8 h; 8—27 $^{\circ}$ C 时 IPTG 诱导 8 h; 9—37 $^{\circ}$ C 时 IPTG 诱导 8 h

图6 不同时间和不同温度表达产物的 Western Blot 检测



M—蛋白 Marker; 1—牛血清白蛋白;

2~3—多克隆抗体

图8 多克隆抗体 SDS—PAGE 电泳

源刺激后,其脾、肾、肝等器官中的黑色素巨噬细胞增多^[15],MHC II β 基因在西伯利亚鲟脾脏组织中有较高的基础表达^[14]。因此本研究以富含淋巴细胞的西伯利亚鲟脾脏为材料,提取 RNA,进行反转录,扩增 MHC II β 基因。引物设计引入的酶切位点应避免在扩增的基因内部出现,质粒 PET30a 在 N 端和 C 端各有 1 个 6 - His 标签,插入目的基因后 C 端的 6 - His 标签在终止密码子之后不再表达,因此引物设计只保留了 N 端的 6 - His 标签,用于 Western 免疫印迹和蛋白纯化。

3.2 重组蛋白的分子量

试验中用于构建重组质粒的西伯利亚鲟 MHC II β 的 OFR 为 801 bp,其中信号肽序列为 102 bp,用

于构建的重组蛋白不包含此信号肽序列,为 699 bp,编码 233aa,构建的 Pet30 α - *MHC II* β 融合蛋白为 278aa,使用 DNASTar 中的 Editseq 预测为 32 ku。而在 SDS - PAGE 电泳时预染彩虹蛋白 Marker 显示分子量约为 36 ku,这是因为 SDS - PAGE 电泳时分子量 Marker 尤其是预染蛋白 Marker,只是一个参考值,不能作为绝对标准。通常情况下,非预染蛋白 Marker 往往比预染蛋白 Marker 具有更准确的蛋白质分子量估算结果,这是因为预染蛋白 marker 为确保一致的迁移率,蛋白会带有饱和标记的染料,可能会使蛋白的原始分子量和表观分子量之间的差异增大。但预染蛋白 marker 在免疫印迹时可以评估蛋白转印到膜上的效率和指示蛋白分子量。另外,电泳的行为受很多因素的影响,与蛋白的氨基酸组成、修饰情况密切相关,因此 SDS - PAGE 不一定能够准确反映分子量的大小,尤其是有的蛋白易形成二聚体,还有一些比较难变性而又形成紧凑的球形结构的蛋白,在用常规方法电泳时会出现异常行为,表观分子量与实际分子量不符。Abraham 等在研究脊髓灰质炎病毒多肽 SDS 电泳迁移时发现,随着分子半径的变化,SDS 结合增加,分子电荷增大,相对迁移速度加快,表观分子量值降低,在 SDS 中加入尿素或者甲酰胺能使部分多肽的变性更完全、电泳动更快、表观分子量降低^[16]。例如,核糖核酸酶是一种低分子量的酸性蛋白质,它有 3 个二硫桥,这种蛋白质在某些情况下表现出异常的电泳行为,未还原蛋白的电泳迁移率与其分子质量大致对应,而还原蛋白的迁移则与蛋白质二聚体的预期分子质量一致,在某种条件下,该蛋白不结合 SDS,其电泳迁移性仅由其静电荷和水动力特性决定。因此理论分子量可以用软件预测,应用分子筛可以得到准确的蛋白理论值。为了检验本试验中表达的融合蛋白的特异性和正确性,试验中利用融合蛋白的 6 - His 标签进行 Western Blot,结果表明,彩虹蛋白 Marker 显示表观分子量约为 36ku 的蛋白正是所构建的融合蛋白。

3.3 原核表达系统

将外源基因克隆在含有 lac 启动子的表达载体中,让其在 *E. coli* 中表达,宿主菌起初生长时 lac I 产生的阻遏蛋白与 lac 操纵基因结合,阻断了外源基因的转录及表达,当向培养基中加入 lac 操纵子的诱导物 IPTG(异丙基硫代 - β - D - 半乳糖),阻遏蛋白不再与操纵基因结合,使得外源基因得以大量转录并高效表达,未加 IPTG 诱导的菌株不能高

效表达外源蛋白。本试验 SDS - PAGE 电泳检测时发现未加 IPTG 诱导的对照组有微弱的目的蛋白条带,但 Western Blot 时没有检测到,推测表达菌株不加 IPTG 也可能会有极少量表达;但由于表达量低,结合的抗体少,致使 Western 免疫印迹未能检出。

在温度较低时诱导表达,蛋白质合成速率降低,多肽折叠的动力学会发生改变,可能会使蛋白正确折叠的比例增加,更有利于形成稳定的可溶性蛋白^[17]。但本试验中在 27 °C 时诱导表达的融合蛋白表达量明显低于 37 °C 时的量,因此本试验没有验证较低温度时表达蛋白的可溶性,这还需进一步研究。

一般来说由于 *MHC* 基因具有高度的多态性,制备单克隆抗体具有筛选困难和效率低下的问题^[18],因此本试验利用纯化的重组蛋白免疫兔子制备了效价高且特异性强的多克隆抗体。

总之,本研究成功构建了西伯利亚鲟 Pet30 α - *MHC II* β 原核表达载体,并进行了结果鉴定,制备了兔多克隆抗体,为从蛋白水平研究 *MHC II* β 的生物学功能和参与机体的免疫应答调控提供参考。

参考文献:

- [1] 丁少雄,张之文,杜佳莹,等. 赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) *MHC II* β 基因的克隆与表达多态性分析[J]. 海洋学报(中文版),2009,31(2):129 - 138.
- [2] Buonocore F, Randelli E, Casani D, et al. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the *MHC* class - II beta chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(4): 853 - 866.
- [3] 张舒婕,龚炎光,俸艳萍,等. 鸭 *MHC II* β 基因的克隆、表达及多克隆抗体的制备[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(11):1612 - 1615.
- [4] Jiang F B, Chen C, Deng Y J, et al. Analysis of porcine *MHC* expression profile [J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(9): 880 - 890.
- [5] 林洋,谭娜,贾平,等. 鸡 *MHC II* α 、 β 链基因重组原核表达载体的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(3):136 - 138.
- [6] 于文博,朱克诚,郭华阳,等. 卵形鲳鲹 *MHC II* β 基因的克隆与表达分析[J]. 南方水产科学,2017,13(4):69 - 79.
- [7] 徐志本,余为一,仲大莲,等. 鸡 *MHC II* β 链基因的克隆和表达及其抗体制备[J]. 安徽农业大学学报,2006,33(1):51 - 55.
- [8] 于辉,李波,李华,等. 鱼类主要组织相容性 II 类基因的研究进展[J]. 中国水产科学,2007,14(2):336 - 342.
- [9] 王重庆. 分子免疫学基础[M]. 北京:北京大学出版社,1997.
- [10] 王晓冰,刘至治,李强,等. 金钱鱼 *MHC II* β 基因结构、多态性与组织表达分析[J]. 中国水产科学,2016,23(1):21 - 33.
- [11] 茅莉娜,冯娟,李玉谷,等. 军曹鱼 *MHC II* β 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析[J]. 动物学杂志,2010,45(4):118 - 128.
- [12] 何佳男,罗文娜,刘晓春,等. 尼罗罗非鱼主要组织相容性复合

黄伟卿, 汤桂津, 吴秀珠, 等. 饲料中添加太子参提取液对大黄鱼血液免疫指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(20): 206–211.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.20.031

饲料中添加太子参提取液对大黄鱼血液免疫指标的影响

黄伟卿^{1,2,3}, 汤桂津¹, 吴秀珠¹, 刘 铮¹, 林培华³, 阮少江¹, 郭团玉⁴, 宋 炜⁵

(1. 宁德师范学院生命科学院, 福建宁德 352100; 2. 闽东水产品精深加工福建省高校工程研究中心, 福建宁德 352100;

3. 福建省宁德市鼎诚水产有限公司, 福建宁德 352100; 4. 厦门海洋职业技术学院海洋生物学院, 福建厦门 361000;

5. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要:将太子参根须提取液(浓度为 40 mg/mL)分别按添加量 0.5% ($C_{0.5}$)、1.0% ($C_{1.0}$)、1.5% ($C_{1.5}$) 和 2.0% ($C_{2.0}$) 添加饲料饲喂大黄鱼, 在饲喂 15、30、60、120 d 分别抽取血液进行吞噬活性测定, 同时分离血清测定免疫球蛋白(IgG)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、溶菌酶(LZM)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性等生化指标, 探究太子参提取液对大黄鱼血液免疫指标的影响, 试验周期为 120 d。结果显示: (1) 饲喂 30 d 时, $C_{1.0}$ 组的 SOD 活性 [(343.74 ± 0.13) U/mg] 和 IgG 含量 [(0.42 ± 0.06) g/L] 最大, $C_{0.5}$ 组的 LZM 活性 [(7.35 ± 0.02) U/mL] 达到最高值; 饲喂 15 d 时 $C_{1.5}$ 组的 CAT 活性 [(5.75 ± 0.02) U/mL] 最高。随着饲喂时间增加, 各血清免疫指标均出现一定程度上的先上升后下降再上升的趋势, SOD 活性除 60 d 外, 其余时间点各试验组均高于对照组。而添加太子参提取液各试验组 IgG 含量仅在 120 d 时比对照组低。(2) 饲喂 120 d 时, 添加太子参提取液各试验组其吞噬百分率和吞噬指数均显著高于对照组 ($P < 0.05$), $C_{1.0}$ 组吞噬细胞的吞噬百分率 (63.3 ± 0.03)% 和吞噬指数 (2.70 ± 0.10) 最大。综上所述, 太子参提取液具有提高大黄鱼非特异性免疫功效, 以添加量 0.5% ~ 1.5% 为宜。

关键词: 大黄鱼; 太子参提取液; 血液; 免疫指标; 吞噬指数

中图分类号: S965.322 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)20-0206-06

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属鲈形目

收稿日期: 2021-11-03

基金项目: 国家重点研发计划——蓝色粮仓科技创新专项(编号: 2019YFD0900904); 福建省高校产学研联合创新项目(编号: 2021N5005); 中央引导地方科技发展专项(编号: 2021L3030、2021L3063); 福建省科技计划引导性项目(编号: 2020Y0059); 福建省特色药用植物工程技术研究中心开放课题(编号: PP202101); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费(编号: 2022QNL030001-1)。

作者简介: 黄伟卿(1988—), 男, 福建漳州人, 副教授, 从事水产增殖研究。E-mail: 393634584@qq.com。

通信作者: 郭团玉, 正高级实验师, 从事水产生物养殖研究。E-mail: gty200999@163.com。

体Ⅱβ(MHCⅡβ)基因的克隆、表达和多态性[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2018, 57(1): 7–20.

[13] 田照辉, 徐绍刚, 王 巍, 等. 急性热应激对西伯利亚鲟 HSP70 mRNA 表达、血清皮质醇和非特异性免疫的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 344–350.

[14] 田照辉, 徐绍刚, 胡红霞, 等. 西伯利亚鲟 MHCⅡβ 基因克隆、组织分布及细菌感染后的表达变化[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 56–62.

[15] 张玉喜. 重要海水养殖鱼类 MHCⅡ 基因克隆、表达及多态性分

(Perciformes) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄鱼属 (*Larimichthys*), 主要分布在我国南海、东海和黄海南部, 为暖水性集群洄游鱼类, 生活于近海的中、下层, 因其具有肉质细嫩, 味道鲜美, 营养价值高等特点, 深受广大消费者的青睐^[1–2]。20 世纪 70 年代, 大黄鱼海上捕捞量高达 12 万 t, 位于我国四大传统鱼类的主捕对象之首^[3–4]。后因过度捕捞, 大黄鱼种质资源日渐匮乏, 濒临枯竭。为对大黄鱼种质资源进行保护, 1985 年水产科技人员利用福建省宁德市官井洋为大黄鱼内湾性产卵场, 在第 6 个国家五年计划期间突破了大黄鱼亲本保活、驯养、人工育苗等技术瓶颈, 首创大黄鱼全人工繁养技术。经过

析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.

[16] Abraham G, Cooper P D. Anomalous behavior of certain poliovirus polypeptides during SDS – gel electrophoresis [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 73(2): 439–446.

[17] 张舒婕, 邓干臻, 龚炎长, 等. 鸭 MHCⅡα 基因的表达纯化与抗体制备[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(4): 464–467.

[18] 叶 平, 余为一. 鸡 MHC II 类分子部分基因的原核表达及单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15668–15669.