



## 草鱼 IFN $\alpha$ 和 IFN $\delta$ 重组蛋白表达、纯化及单克隆抗体制备

王梓璇<sup>1</sup>, 贾 钊<sup>1</sup>, 邬恺正<sup>1</sup>, 朱晓真<sup>1</sup>,  
王俊亚<sup>1</sup>, 冯 浩<sup>2</sup>, 邹 钧<sup>1\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 省部共建淡水鱼类发育生物学  
国家重点实验室, 湖南 长沙 410081)

**摘要:** 为系统研究草鱼 I 型干扰素的合成、分泌和免疫功能, 本实验在大肠杆菌中表达并提纯了草鱼 IFN $\alpha$  (CiIFN $\alpha$ ) 和 IFN $\delta$  (CiIFN $\delta$ ) 重组蛋白。将 CiIFN $\alpha$  和 CiIFN $\delta$  成熟肽分别克隆到 pET-21d 或 pEHISTEVb 表达载体上, 并转化到大肠杆菌中; IPTG 诱导表达获得 CiIFN $\alpha$  和 CiIFN $\delta$  成熟肽的包涵体, 经盐酸胍变性、蛋白复性和浓缩后, 利用分子筛层析获得了纯度较高的重组蛋白。用重组蛋白免疫小鼠, 通过 PEG 法诱导得到杂交瘤细胞; 将稳定分泌抗体的阳性细胞株细胞悬液注射入小鼠腹腔, 制备腹水抗体并进行纯化。本实验纯化了草鱼 CiIFN $\alpha$  和 CiIFN $\delta$  各 2 株抗体, 并采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、蛋白质印迹法 (Western blot) 和免疫荧光法对其进行了较全面的鉴定。实验表明, CiIFN $\alpha$  和 CiIFN $\delta$  单克隆抗体特异性好、效价高, 能够特异识别在大肠杆菌和真核细胞中表达的重组蛋白, 且不存在 CiIFN $\alpha$  和 CiIFN $\delta$  分子间的交叉识别。本研究制备的单克隆抗体为深入研究草鱼干扰素的细胞来源和蛋白表达规律奠定基础。

**关键词:** 草鱼; 干扰素; 细胞因子; 单克隆抗体; 重组蛋白

**中图分类号:** S 942

**文献标志码:** A

干扰素 (interferon, IFN) 是关键的抗病毒细胞因子, 在先天免疫和获得性免疫中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。哺乳动物干扰素分为 3 种类型, 即 I 型 (包括 IFN $\alpha/\beta$  等)、II 型 (IFN $\gamma$ ) 和 III 型 (IFN $\lambda$ )<sup>[2]</sup>。I 型干扰素由病毒或细菌感染诱导产生, 其中 IFN $\beta$  由大多数类型细胞产生, 而 IFN $\alpha$  的来源主要局限于免疫细胞, 浆细胞样树突状细胞可分泌大量 IFN $\alpha$ <sup>[3-4]</sup>。

哺乳动物 I 型干扰素结合同一个异源二聚体跨膜受体, 该受体复合物由 IFNAR1 和 IFNAR2 组成<sup>[5-7]</sup>。干扰素受体在激活后招募蛋白酪氨酸激

酶——Janus 激酶 1 (JAK1) 和酪氨酸激酶 2 (Tyk2), 并磷酸化转录激活子 STAT1 和 STAT2, 磷酸化的 STAT1 和 STAT2 形成二聚体, 与干扰素调节因子 9 (IRF9) 组装成干扰素刺激因子 3 (ISGF3), ISGF3 从细胞质转位至核内, 作用于干扰素刺激基因 (ISG) 启动子区段的干扰素刺激响应元件 (ISRE), 启动 ISG 的表达<sup>[8-11]</sup>, 从而抑制病毒基因的转录、翻译和复制<sup>[10]</sup>。

与哺乳动物类似, 鱼类 I 型干扰素存在多个拷贝<sup>[12-13]</sup>, 它们串联排在染色体上。I 型干扰素基因的拷贝数量在不同鱼类中存在很大差异<sup>[14]</sup>,

收稿日期: 2021-08-27 修回日期: 2021-10-10

资助项目: 国家自然科学基金 (32030112)

第一作者: 王梓璇 (照片), 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: m190100358@st.shou.edu.cn

通信作者: 邹钧, 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: jzhou@shou.edu.cn



例如在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 中已经发现 11 个 I 型干扰素基因拷贝<sup>[15]</sup>, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中至少存在 23 个拷贝<sup>[16]</sup>; 鲤科 (Cyprinidae) 鱼类如斑马鱼 (*Danio rerio*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) I 型干扰素基因拷贝数量相对较少, 斑马鱼干扰素基因只有 4 个拷贝<sup>[14]</sup>, 其中 *ifn $\phi$ 1-3* (*ifna*、*ifnc1* 和 *ifnc2*) 位于在 3 号染色体上, 与 CD79b 连锁, *ifn $\phi$ 4* (*ifnd*) 位于 12 号染色体上; 同样, 草鱼干扰素基因有 4 个拷贝, *Ciifn1* (*Ciifna*)、*Ciifn2* (*Ciifnc1*) 和 *Ciifn3* (*Ciifnc2*) 位于 2 号染色体, 而 *CiIFN4* (*Ciifnd*) 位于 9 号染色体<sup>[17]</sup>。根据半胱氨酸的组成和排列形式, 鱼类 I 型干扰素可分为 1 组 (含 2 个半胱氨酸) 和 2 组 (含 4 个半胱氨酸)<sup>[14]</sup>。根据系统发育分析, 它们可分为 7 大类, 即 IFNa~f 和 IFNh<sup>[18]</sup>, 鱼类 I 型干扰素 1 组包括 IFNa、IFNd、IFNe 和 IFNh, 2 组包括 IFNb、IFNc 和 IFNf<sup>[17, 19]</sup>。鱼类 I 型干扰素蛋白晶体结构已经得到解析, 斑马鱼 IFN $\phi$ 1 (IFNa) 和 IFN $\phi$ 2 (IFNc1) 具有典型的 6 螺旋结构<sup>[20]</sup>, 它们能够诱导干扰素刺激基因的表达, 增强细胞的抗病毒能力, 而斑马鱼 IFN $\phi$ 4 (IFNd) 具有较弱的抗病毒活性, 与之相比, 对草鱼 I 型干扰素的结构和功能研究相对有限。

鱼类干扰素的表达在转录水平得到了较深入的研究。一般来讲, 不同鱼类 I 型干扰素基因, 在病毒感染或 Poly(I:C) 刺激后, 表达水平均显著提高<sup>[21]</sup>。1 组 I 型干扰素 (含 2 个半胱氨酸) 基因可由大多数细胞类型产生。2 组 I 型干扰素 (含 4 个半胱氨酸) 基因的常量表达水平相对较低, 在特定的组织和细胞中诱导表达<sup>[16, 22]</sup>。Zou 等<sup>[14]</sup>发现虹鳟 *ifnb* 在头肾白细胞中被 Poly(I:C) 诱导表达, 但在成纤维细胞 (RTG-2) 中则不表达。利用原位杂交技术, Svingerud 等<sup>[23]</sup>证明 *ifna* 和 *ifnc* 在 Poly(I:C) 刺激的头肾、脾脏、鳃、肝脏和心脏细胞中表达, 而 *ifnb* 和 *ifnc* 在 R848 刺激的头肾和脾脏细胞中表达<sup>[23]</sup>。迄今, 已有大量基于实时定量 PCR (qPCR) 的转录表达分析, 但由于缺乏特异性好的单克隆抗体, I 型干扰素的细胞来源和组织分布尚不明确。

草鱼是我国重要的淡水养殖鱼类之一, 草鱼养殖业的可持续性发展受到草鱼出血病的制约<sup>[24]</sup>。本研究旨在制备特异性强的草鱼干扰素单克隆抗体, 为探明宿主干扰素的产生和细胞来源奠定基础, 所建立的方法为制备高质量的鱼类细胞因子单克隆抗体提供技术借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、菌种及细胞

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta (DE3) 感受态细胞 (本实验室保存)、SPF BALB/c 雌性小鼠 (*Mus musculus*) (北京华大蛋白质研发中心有限公司)、小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0 Cell) (北京华大蛋白质研发中心有限公司)、人胚肾细胞 293 (HEK293 细胞) (本实验室保存)、草鱼肾细胞系 (CIK 细胞系)。

### 1.2 主要试剂

ExTaq Mix 和 Prime star 购于 TaKaRa; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 OMEGA; LB 液体培养基、琼脂粉、琼脂糖、氯化钠、甘油、Triton X-100、尿素、磷酸钠、10×TBS 漂洗液购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 限制性内切酶 (*Nco* I-HF<sup>®</sup>、*Bam*HI) 购于 BioLabs 公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、Tris-HCl、DTT、EDTA 购于 VWR 公司; 氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽、盐酸胍购于 Amresco 公司; HAT、聚乙二醇 (PEG-4000)、HT 培养基添加剂、二甲基亚砷购于 Sigma-Aldrich<sup>®</sup>、高糖 DMEM 基础培养液、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素、IMDM 培养基、磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 购于 gibco 公司; TMB 购于 Solarbio<sup>®</sup>公司; 硫酸购于国药; 柠檬酸钠购于 aladdin 公司; 考马斯亮蓝购于 BiofRox 公司; Tween 20 购于 GPC 公司; Brefeldin A 和 RIPA 裂解液购于碧云天公司; Lipofectamine TM3000 购于 ThermoFisher 公司, Goat Anti-Mouse Ig, Human ads-UNLB 购于 Southern Biotech 公司, IRDye<sup>®</sup> 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody 购于 LI-COR; jetPRIME 购于 Polyplus Transfection 公司。

### 1.3 方法

*CiIFNa*、*CiIFNd* 表达载体构建 从 NCBI 数据库中获取 *Ciifna* (NCBI 登录号: ABC87312.1) 和 *Ciifnd* (NCBI 登录号: AMT92192.1) 基因的编码区序列, 送苏州金唯智生物科技有限公司合成含 *Ciifna* 和 *Ciifnd* 片段的 pUC57 质粒。利用 PCR (引物见表 1) 扩增 *Cifna* (从 Cys<sup>23</sup> 开始) 和 *Ciifnd* (从 Cys<sup>20</sup> 开始) 成熟肽, 引物序列中加单划线部分为酶切位点, 为避免碱基移位, 正向引物中添加了碱基 CT (加粗表示), 用限制性核酸内切酶 *Nco* I 和 *Bam*HI 分别酶切表达载体质粒和目的片段, 将目的片段 *CiIFNa* 连接至 pET-21d 载体, *CiIFNd* 连

接至 pEHISTEVb 载体, 质粒被命名为 pET-21d-CiIFNa 和 pEHISTEVb-CiIFNd。获得的表达质粒送金唯智(苏州)生物科技有限公司测序验证。根据 NCBI 数据库获得的编码区序列, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成真核表达质粒: 草鱼 pcDNA3.4-CiIFNa 和 pcDNA3.4-CiIFNd (酶切位点为 *Bam*H I 和 *Hind* III) 和斑马鱼质粒 pcDNA3.1-DrIFN $\phi$ 1 和 pcDNA3.1-DrIFN $\phi$ 4(酶切位点为 *Hind* III 和 *Bam*H I)。

表 1 基因引物信息

Tab. 1 Information of gene primers

| 基因名称<br>genes name | 顺序(5'-3')<br>sequences(5'-3')               | 用途<br>usage              |
|--------------------|---------------------------------------------|--------------------------|
| CiIFNa             | F: CATGCCATGGCTTGCGAATGGCTC<br>GGTCGCTACCGT | 质粒构建<br>plasmid<br>build |
|                    | R: CGGGATCCTTAACGGCGATTGGCG<br>ATGCT        |                          |
| CiIFNd             | F: CATGCCATGGCTTGTCGTTGGATC<br>AAACACAAATTC | 质粒构建<br>plasmid<br>build |
|                    | R: CGGGATCCTTAAACTGGGTCAGA<br>AACGG         |                          |

原核重组蛋白表达及纯化 将 pET-21d-CiIFNa 和 pEHISTEVb-CiIFNd 重组质粒转至大肠杆菌 Rosseta(DE3)感受态细胞, 挑取单克隆菌落, 接种至 50 mL LB 培养基中培养过夜, 然后转入至 3 L LB 培养基中 37 °C 培养约 2 h, 当 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6~0.8 时加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达 6 h, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析发现, 表达的 CiIFNa 和 CiIFNd 蛋白为包涵体, 包涵体变性、复性具体方步骤详见 Qin 等<sup>[25]</sup>。采用稀释复性方法, 取 10 mL 30 mg/mL 的包涵体, 加入 1 L 预冷复性液中进行复性(于 4 °C 条件下完成)。将复性好的蛋白加入搅拌式浓缩杯中, 在 0.4 kPa 氮气压力下, 使溶液滤过 10 ku 超滤膜, 浓缩可溶性蛋白, 将浓缩的蛋白置换于 300 mmol/L 蛋白缓冲液中 (300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)。使用 AKTA pure 蛋白纯化仪进行分子筛层析纯化可溶性蛋白, 纯化方式详见参考文献<sup>[26]</sup>。

真核重组蛋白表达 将 HEK293 细胞接种于 6 孔细胞培养板培养 6 h, 待细胞融合至 80% 以上, 用 Lipofectamine<sup>TM</sup>3000 转染试剂盒分别将 pcDNA3.4-CiIFNa 和 pcDNA3.4-CiIFNd 表达质粒转染至贴壁 HEK293 细胞中, 并于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 42 h 后, 加入蛋白转运抑制剂 (Brefeldin A), 继续培养 6 h。用 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 冰上裂解细胞。

小鼠淋巴细胞制备 用 CiIFNa、CiIFNd 重组蛋白按 60  $\mu$ g 蛋白每只小鼠的量, 皮下注射初次免疫 4 只 SPF BALB/c 雌性小鼠, 20 d 后皮下注射加强免疫, 然后每隔 15 d 进行 3 次加强免疫, 免疫蛋白量为 30  $\mu$ g/只。最后 1 次加强免疫 7 d 后眼眶取血, ELISA 检测血清效价: 用免疫原 2  $\mu$ g/mL, 4 °C 包被过夜; 2% 脱脂奶粉, 37 °C 封闭 2 h; 血清从 200 倍开始 2 倍梯度稀释, 空白对照为磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 阴性对照为免疫前阴性血清 200 倍稀释。选取效价最高的小鼠 (2#小鼠) 作为实验动物, 用 50  $\mu$ g 蛋白免疫原腹腔冲击 2#小鼠, 小鼠免疫由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成。

杂交瘤细胞的建立 将小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0 cell) 连续传代培养, 保持细胞在融合前生长状态良好, 密度适中, 达到最佳生长状态时, 选取 2#小鼠制备单克隆抗体, 方法依照单克隆抗体制备试验手册<sup>[27]</sup>, 无菌操作取小鼠脾脏, 分离小鼠脾脏细胞上清, 拍打离心管底充分悬浮细胞, 将离心管放入 37 °C 温水中, 在 1 min 内缓慢加入 1 mL 的 PEG, 在温水中静置 1 min, 在 2 min 内缓慢加入 2 mL 无血清 IMDM 培养基, 随后在 2 min 内缓慢加入 8 mL 无血清 IMDM 培养基, 离心收集细胞<sup>[28]</sup>。

杂交瘤细胞筛选 将融合后的细胞用含 HAT 试剂的半固体培养基 (含有 2.3% 甲基纤维素、IMDM 粉末培养基、NaHCO<sub>3</sub>、青霉素、链霉素、支原体抗生素、三蒸水和 HAT) 进行培养。12 d 后挑取 93 个单克隆细胞于 96 孔细胞培养板 (事先用胸腺细胞铺板, 此胸腺细胞是免疫小鼠取出的小鼠胸腺研磨而成, 100  $\mu$ L/孔) 培养, 按顺序编号 1~93(未全部筛选, 表 1, 表 2)。用免疫原包板, 对挑选的克隆采用 ELISA 方法筛选, 获得稳定分泌 CiIFNa、CiIFNd 单克隆抗体的杂交瘤细胞株<sup>[29]</sup>。

亚类鉴定 用包被液稀释“亚类包被抗体” Goat Anti-Mouse Ig, Human ads-UNLB, 终浓度为 2  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/孔, 4 °C, 过夜, 然后用洗液洗涤 3 次; 2% 脱脂奶粉 (溶剂为 PBS) 封闭, 200  $\mu$ L/孔, 37 °C 孵育 2 h, 后用 PBST 洗涤 3 次; 加入一抗 (杂交瘤细胞培养上清液)、阴性对照 (SP2/0 培养上清液), 100  $\mu$ L/孔, 37 °C 孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次; 用 PBS 稀释各型亚类二抗 Goat Anti-Mouse IgM、IgG1、IgG2a 和 IgG2b 等, 100  $\mu$ L/孔, 分别加入适当的孔中, 37 °C 孵育 1 h,



表 2 *CiIFNa* 杂交瘤细胞上清抗体效价测定及亚型鉴定结果

Tab. 2 Titer and subtype of *CiIFNa* antibodies from hybridoma cell lines

| 编号<br>no. | OD值<br>OD value | 抗体亚型<br>Ig subtype | 编号<br>no.   | OD值<br>OD value | 抗体亚型<br>Ig subtype |
|-----------|-----------------|--------------------|-------------|-----------------|--------------------|
| 1         | 1.078           |                    | 13          | 0.077           |                    |
| 2         | 0.068           |                    | 14          | 0.047           |                    |
| 3         | 0.105           |                    | 15          | 0.135           |                    |
| 4         | 0.073           |                    | 16          | 0.029           |                    |
| 5         | 0.096           |                    | 17          | 0.887           | G2a                |
| 6         | 0.644           | G1                 | 18          | 1.087           |                    |
| 7         | 0.068           |                    | 19          | 0.517           | G1                 |
| 8         | 0.809           | G1                 | 20          | 0.069           |                    |
| 9         | 1.272           | G2b                | 21          | 0.131           |                    |
| 10        | 0.845           | G1                 | 阴性 negative | 0.038           |                    |
| 11        | 0.136           |                    | 空白 blank    | 0.035           |                    |
| 12        | 1.040           | G1                 | 阳性 positive | 1.222           |                    |

取出后用洗液洗涤 3 次；加入显色液 (1% A 液+10% B 液)(A 液：1% TMB 溶于 DMSO，B 液：0.1% CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>柠檬酸缓冲液)100 μL/孔，显色时间为 10 min。每孔加入 50 μL 0.5 mol/L 硫酸终止显色。在 450 和 630 nm 波长下测定吸光值。

**Western blot 鉴定** 制备 *CiIFNa*、*CiIFNd* 原核及真核重组蛋白，与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合，100 °C 煮沸 10 min 制样，经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，采用半干转方法将蛋白转至 PVDF 膜<sup>[30]</sup>。5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭 1 h，1：1 000(体积比) 稀释抗体，4 °C 孵育过夜，洗膜；用 IRDye® 800CW Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody [1：10 000(体积比) 稀释] 4 °C 孵育 1 h；洗膜，双红外激光显色，在 Odyssey CLx 成像系统观察并拍照。

**单克隆抗体纯化** 用偶联缓冲液 (20 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0) 以 1：3 稀释血清，12 000 r/min 4 °C 离心 10 min，用 0.22 μm 滤膜过滤，除去脂肪、细胞残渣及小颗粒物质。用 10 倍柱体积的相应偶联缓冲液平衡分子筛柱，流速为 1 mL/min。把样品注入层析柱上端接口，收集流出液，然后用 5 倍柱体积的偶联缓冲液过柱，最后用 5 倍柱体积洗脱缓冲液 (0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液，pH 3.4) 洗脱抗体，收集于 EP 管中，并迅速用 1 mol/L pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液调整 pH 值至 7.0，用 0.01 mol/L PBS 缓冲液将抗体透析

12 h，换液 3 次。

**纯化抗体效价测定** 用免疫原检测纯化的抗体效价，将抗体从 1：200 起倍比稀释到 1：204 800，37 °C 孵育 2 h，洗板；每孔加入 100 μL 稀释的 Sheep Anti-Mouse IgG Secondary Antibody (HRP)(1：3 000)，37 °C 孵育 2 h，洗板；每孔加入 100 μL 显色液，37 °C 显色 15 min；2 mol/L 硫酸终止显色，在 450 和 630 nm 波长下测定吸光值。

**抗体纯度测定** 混合纯化后的抗体和蛋白上样缓冲液，100 °C 煮沸 10 min 制样，SDS-PAGE 凝胶电泳，考马斯亮蓝染色、脱色液脱色，观察并拍照。

**荧光素标记 (FITC)** 用 pH 9.5 的碳酸盐缓冲液稀释抗体浓度至 10 mg/mL。将 2 mL 抗体溶液置于干净的烧杯中。称取 0.5 mg FITC 荧光素并将其溶解在 0.1 mL DMSO 中，随即缓慢加入抗体溶液，加入时轻轻搅拌，室温避光反应 2 h。用分子柱层析去除未结合的 FITC，收集标记抗体。

**免疫荧光分析** 将 CIK 细胞培养在盖玻片上，使用 jetPRIME 转染试剂将 pcDNA3.4-*CiIFNa* 和 pcDNA3.4-*CiIFNd* 质粒转染至 CIK 细胞中，42 h 后加入蛋白转运抑制剂 (Brefeldin A)，48 h 后吸弃培养基，用 PBS 清洗 2 次，用 4% 多聚甲醛固定 10 min，用 PBS 清洗 2 次，用破膜封闭试剂 (含 5% FBS、0.5% Triton X-100) 破膜封闭 1 h，用破膜封闭试剂按 1：500 稀释抗体，4 °C 孵育 4 h，用 DAPI 染色 10 min，用 PBST(含 0.25% Triton X-100) 洗 3 次，每次 5 min，在激光共聚焦显微镜 (Leica SP8) 下观察拍照。

2 结果

2.1 *CiIFNa*、*CiIFNd* 重组蛋白原核表达及纯化

从 NCBI 数据库中获取 *Ciifna*、*Ciifnd* 的编码区序列，分别将其编码成熟肽的片段构建到表达载体上。*Ciifna*(483 bp，从 Cys<sup>23</sup> 开始) 连接至表达载体 pET-21d，质粒命名为 pET-21d-*CiIFNa*；*Ciifnd* (465 bp，从 Cys<sup>20</sup> 开始) 连接至表达载体 pEHISTEVb，质粒命名为 pEHISTEVb-*CiIFNd*(图 1-a)。将 pET-21d-*CiIFNa* 和 pEHISTEVb-*CiIFNd* 转化至大肠杆菌 (Rosetta DE3) 中，挑取阳性单克隆菌 (图 1-b, c)，引物分别为特异性引物和 T7 通用引物，采用 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析诱导表达情况 (图 2-a)，发现 1 mmol/L

IPTG 诱导重组蛋白表达, 随后培养 3 L 大肠杆菌, 收集菌体, 破碎后离心分离上清和包涵体, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示, *CiIFN $\alpha$*  和 *CiIFN $\delta$*  包涵体中可见目的蛋白 (大小约 20 ku) 的条带 (图 2-b, c), 表明 *CiIFN $\alpha$*  和 *CiIFN $\delta$*  重组蛋白以包涵体形式表达, 并且表达水平较高。将初步纯化的 *CiIFN $\alpha$*  和 *CiIFN $\delta$*  包涵体用 6 mol/L 盐酸胍进行变性, 采用稀释复性的方法复性蛋白, 将蛋

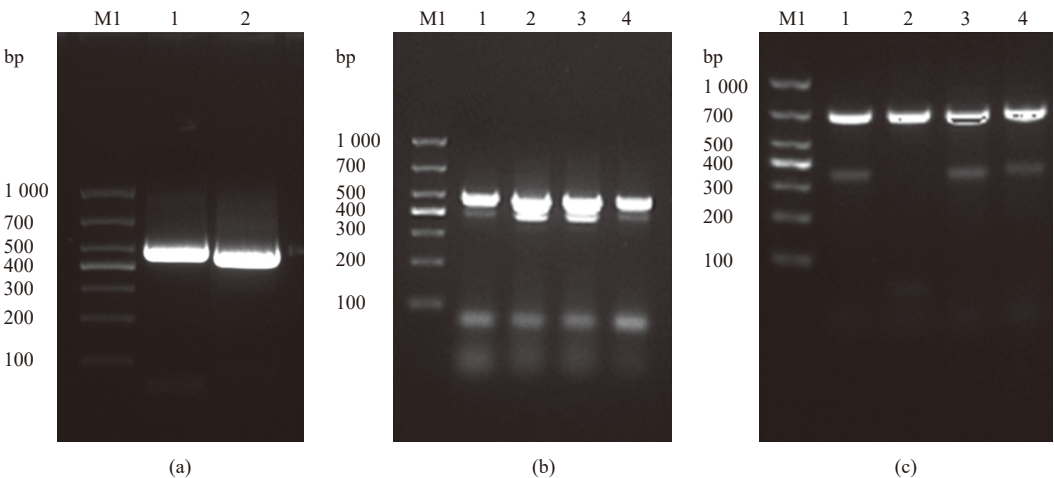


图 1 *Ciifna* 和 *Ciifnd* 基因克隆及阳性菌检测

(a) *Ciifna* 和 *Ciifnd* PCR 扩增, M1. 标准物质 1000, 1. *Ciifna*, 2. *Ciifnd*; (b) *Ciifna* 阳性细菌鉴定, M1. 标准物质 1000, 1. *Ciifna* 阳性菌 1, 2. *Ciifna* 阳性菌 2, 3. *Ciifna* 阳性菌 3, 4. *Ciifna* 阳性菌 4; (c) *Ciifnd* 阳性细菌鉴定, M1. 标准物质 1000, 1. *Ciifnd* 阳性菌 1, 2. *Ciifnd* 阳性菌 2, 3. *Ciifnd* 阳性菌 3, 4. *Ciifnd* 阳性菌 4

Fig. 1 Cloning of *Ciifna* and *Ciifnd* and screening of positive bacterial clones

(a) PCR amplification of *Ciifna* and *Ciifnd* M1, Marker 1000, 1. *Ciifna*, 2. *Ciifnd*; (b) PCR amplification of *Ciifna* positive bacterial colonies, M1. Marker 1000, 1. *Ciifna* positive bacterial clone 1, 2. *Ciifna* positive bacterial clone 2, 3. *Ciifna* positive bacterial clone 3, 4. *Ciifna* positive bacterial clone 4; (c) PCR amplification of *Ciifnd* positive bacterial colonies, M1. Marker 1000; 1. *Ciifnd* positive bacteria 1; 2. *Ciifnd* positive bacterial clone 2; 3. *Ciifnd* positive bacterial clone 3; 4. *Ciifnd* positive bacterial clone 4

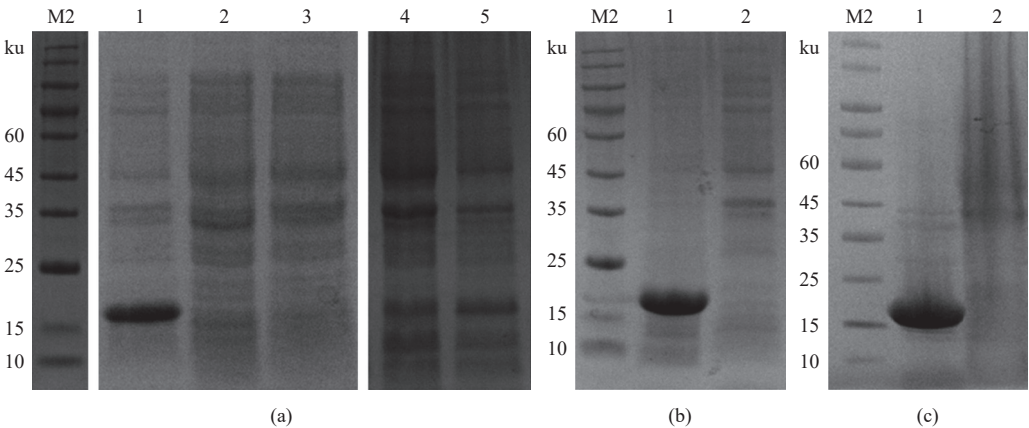


图 2 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 重组蛋白原核表达

(a) *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 重组蛋白小量诱导表达, M2. 蛋白质分子量标准, 1. 诱导后 *CiIFNa* 菌体总蛋白, 2. 未诱导 *CiIFNa* 菌体总蛋白, 3. 阴性 Rosetta 大肠杆菌总蛋白, 4. 诱导后 *CiIFNd* 菌体总蛋白, 5. 未诱导菌体 *CiIFNd* 总蛋白; (b) *CiIFNa* 包涵体和上清分析, M2. 蛋白质分子量标准, 1. *CiIFNa* 包涵体, 2. *CiIFNa* 上清; (c) *CiIFNd* 包涵体和上清分析, M2. 蛋白质分子量标准, 1. *CiIFNd* 包涵体, 2. *CiIFNd* 上清

Fig. 2 Expression of *CiIFNa* and *CiIFNd* recombinant proteins in prokaryotic cells

(a) small scale induction of recombinant *CiIFNa* and *CiIFNd* proteins, M2. protein molecular marker, 1. *CiIFNa* cell lysate after IPTG induction, 2. *CiIFNa* cell lysate without IPTG induction, 3. Rosetta cell lysate without IPTG induction, 4. *CiIFNd* cell lysate after IPTG induction, 5. *CiIFNd* cell lysate without IPTG induction; (b) analysis of *CiIFNa* inclusion bodies and cell supernatant, M2. protein molecular marker, 1. *CiIFNa* inclusion bodies, 2. *CiIFNa* supernatant; (c) analysis of *CiIFNd* inclusion bodies and cell supernatant, M2. protein molecular marker, 1. *CiIFNd* inclusion bodies, 2. *CiIFNd* supernatant

白置换于 300 mmol/L 分子筛缓冲液并浓缩, 使用 AKTA 蛋白纯化仪进行分子筛层析纯化可溶性蛋白。SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 纯化后的 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 分子量大小为 20 ku, 蛋白纯度均大于 90%(图 3)。

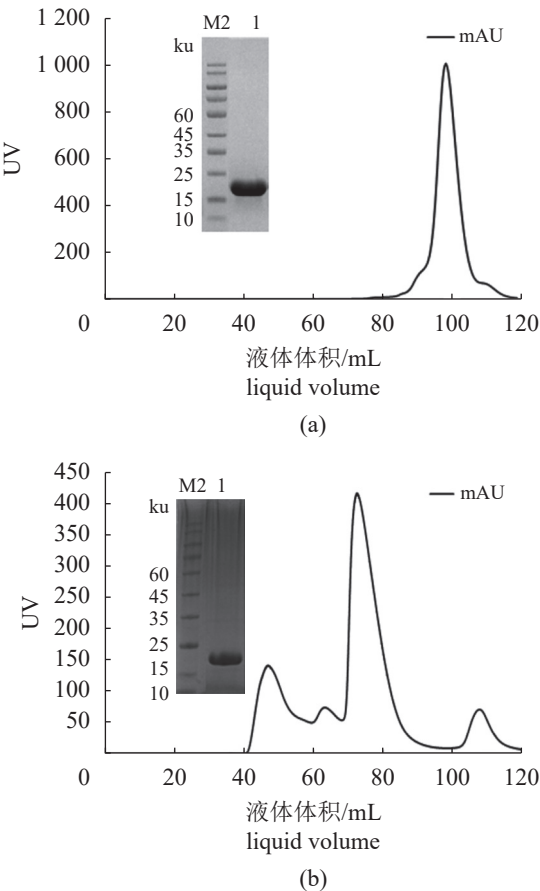


图 3 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 重组蛋白纯化  
(a)*CiIFNa* 蛋白纯化, (b) *CiIFNd* 蛋白纯化; M2. 蛋白质分子量标准, 1. *CiIFNa*, 2. *CiIFNd*

Fig. 3 Purification of *CiIFNa* and *CiIFNd* proteins  
(a) purification of *CiIFNa* protein, (b) purification of *CiIFNd* protein; M2. protein molecular marker, 1. *CiIFNa*, 2. *CiIFNd*

2.2 单克隆细胞筛选及亚型鉴定

采用 ELISA 方法对进行 4 次免疫后的小鼠血清进行抗体分析, 选取抗体效价高的小鼠进行单抗制备。经 ELISA 检测 *CiIFNa* 杂交瘤细胞培养液, 选取针对免疫原的 OD 值大于 0.5 的细胞株, 筛选获得草鱼 *CiIFNa* 6#、8#、9#、10#、12#、17#、19#共 7 株杂交瘤细胞株(表 2)和 *CiIFNd* 2#、10#、25#、34#、35#、38#、40#共 7 株杂交瘤细胞(表 3), 表中阴性为 SP2/0 培养液、空白为 PBS、阳性为阳性血清。IgG 亚类鉴定显示, *CiIFNa* 6#、

8#、10#、12#、19#抗体为 IgG1, 17#抗体为 IgG2a, 9#抗体为 IgG2b。 *CiIFNd* 2#、34#、35#、40#抗体为 IgG1, 10#、25#、38#抗体为 IgG2b。

表 3 *CiIFNd* 杂交瘤细胞上清抗体效价测定及亚型鉴定结果

| Tab. 3 Titer and subtype of <i>CiIFNd</i> antibodies from hybridoma cell lines |                  |                    |           |                  |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|-----------|------------------|--------------------|
| 编号<br>no.                                                                      | OD 值<br>OD value | 抗体亚型<br>Ig subtype | 编号<br>no. | OD 值<br>OD value | 抗体亚型<br>Ig subtype |
| 1                                                                              | 0.042            | G1                 | 25        | 0.954            | G2b                |
| 2                                                                              | 0.938            |                    | 26        | 0.529            |                    |
| 3                                                                              | 0.037            |                    | 27        | 0.518            |                    |
| 4                                                                              | 0.198            |                    | 28        | 0.887            |                    |
| 5                                                                              | 0.438            |                    | 29        | 0.672            |                    |
| 6                                                                              | 0.221            |                    | 30        | 0.030            |                    |
| 7                                                                              | 0.533            |                    | 31        | 0.557            |                    |
| 8                                                                              | 0.337            | G2b                | 32        | 0.672            |                    |
| 9                                                                              | 0.429            |                    | 33        | 0.032            |                    |
| 10                                                                             | 0.866            |                    | 34        | 0.864            | G1                 |
| 11                                                                             | 0.533            |                    | 35        | 0.811            | G1                 |
| 12                                                                             | 0.039            |                    | 36        | 0.213            |                    |
| 13                                                                             | 0.525            |                    | 37        | 0.052            |                    |
| 14                                                                             | 0.050            |                    | 38        | 0.923            | G2b                |
| 15                                                                             | 0.698            | G1                 | 39        | 0.404            |                    |
| 16                                                                             | 0.037            |                    | 40        | 0.848            | G1                 |
| 17                                                                             | 0.107            |                    | 41        | 0.556            |                    |
| 18                                                                             | 0.055            |                    | 42        | 0.048            |                    |
| 19                                                                             | 0.041            |                    | 43        | 0.05             |                    |
| 20                                                                             | 0.234            |                    | 44        | 0.735            |                    |
| 21                                                                             | 0.247            | 阴性                 | negative  | 0.039            |                    |
| 22                                                                             | 0.241            | 空白                 | blank     | 0.043            |                    |
| 23                                                                             | 0.504            | 阳性                 | positive  | 1.013            |                    |
| 24                                                                             | 0.482            |                    |           |                  |                    |

2.3 单克隆抗体鉴定与纯化

Western blot 分析发现, *CiIFNa* 原核及真核重组蛋白均可与免疫小鼠的杂交瘤细胞上清 6#、8#、9#、10#、12#、17#、19#发生特异性反应(图 4-a, b), 但亲和力有差异, 检测的蛋白大小约为 19 ku, 符合预期的 *CiIFNa* 分子量大小(18.82 ku)。 *CiIFNd* 原核及真核重组蛋白均与免疫小鼠的

杂交瘤细胞上清 2#、10#、25#、34#、35#、38#、40# 发生特异性反应, 但亲和力有差异, 检测到的蛋白大小约为 18 ku, 符合预期的 *CiIFNd* 分子量

大小 (18.12 ku)(图 4-c, d)。根据这些结果, 实验纯化了亲和力较高的 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 各 2 株血清抗体 (*CiIFNa* 10#和 12#, *CiIFNd* 25#和 40#)。

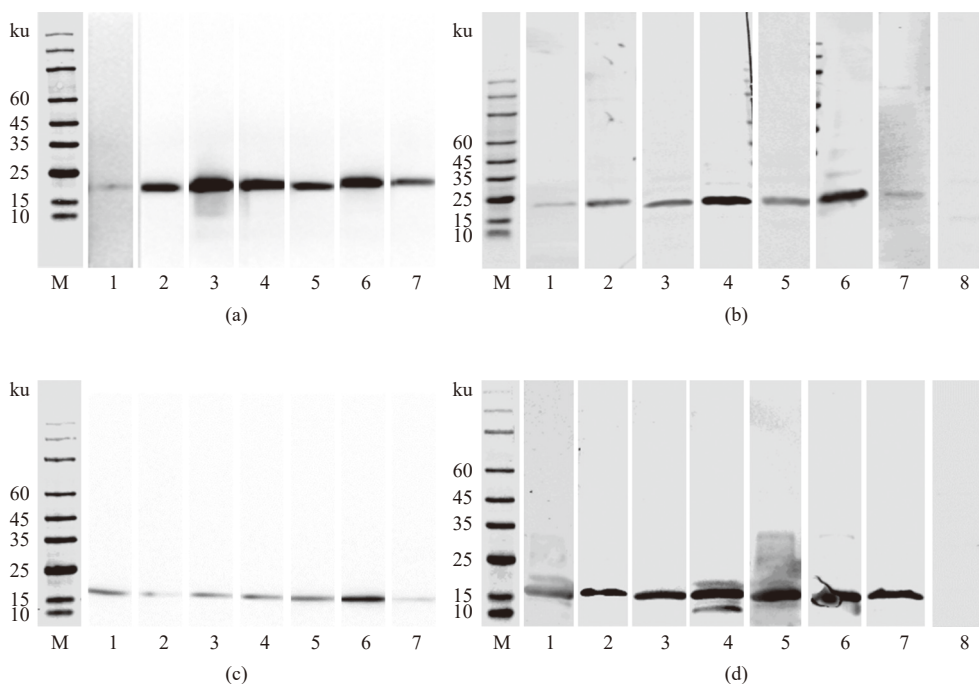


图 4 杂交瘤细胞培养液的 Western blot 分析

(a)*CiIFNa* 原核重组蛋白与杂交瘤细胞培养液的 Western blot 分析, (b) *CiIFNa* 真核重组蛋白与杂交瘤细胞培养液的 Western blot 分析, M. 蛋白质分子量标准, 1. 6#, 2. 8#, 3. 9#, 4. 10#, 5. 12#, 6. 17#, 7. 19#, 8. 阴性对照; (c)*CiIFNd* 原核重组蛋白与杂交瘤细胞培养液的 Western blot 分析, (d) *CiIFNd* 真核重组蛋白与杂交瘤细胞培养液的 Western blot 分析, M. 蛋白质分子量标准, 1. 2#, 2. 10#, 3. 25#, 4. 34#, 5. 35#, 6. 38#, 7. 40#, 8. 阴性对照

Fig. 4 Western blot analysis of culture media of hybridoma cell lines

(a) Western blot analysis of bacteria-derived recombinant *CiIFNa* protein using hybridoma cell culture medium, (b) Western blot analysis of HEK293 cell-derived recombinant *CiIFNa* protein using hybridoma cell culture medium, M. protein molecular marker, 1. 6#, 2. 8#, 3. 9#, 4. 10#, 5. 12#, 6. 17#, 7. 19#, 8. negative control; (c) Western blot analysis of bacteria-derived recombinant *CiIFNd* protein using hybridoma cell culture medium, (d) Western blot analysis of HEK293 cell-derived recombinant *CiIFNd* protein and hybridoma cell culture medium, M. protein molecular marker, 1. 2#, 2. 10#, 3. 25#, 4. 34#, 5. 35#, 6. 38#, 7. 40#, 8. negative control

## 2.4 单克隆抗体纯化

通过层析柱大规模纯化了 *CiIFNa* (10#和 12#, 命名为 GC10-IFNa 和 GC12-IFNa) 和 *CiIFNd* (25#和 40#, 命名为 GC25-IFNd 和 GC40-IFNd), 各获得 5 mg 抗体, SDS-PAGE 电泳结果显示抗体纯度较高, 每株抗体均含 2 条链, 即重链大小为 55 ku, 轻链大小为 25 ku (图 5), 4 株抗体均符合小鼠免疫球蛋白重链和轻链的理论值。

## 2.5 单克隆抗体亲和常数检测

用 ELISA 方法检测纯化后的抗体效价, 用 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 原核重组蛋白作为包被抗原, 按照 1 : 200 至 1 : 204 800 梯度稀释纯化后的抗体作为一抗, 二抗选择 Sheep Anti-Mouse IgG Second-

ary Antibody(HRP) 进行检测。GC10-IFNa (图 6-a) 亲和常数 (亲和常数 =  $150\,000 \times A / \text{抗体浓度}$ ,  $A$  代表 1/2 OD 值所对应的抗体稀释倍数) 为  $1.46 \times 10^{10}$ , GC12-IFNa (图 6-b) 亲和常数为  $4.04 \times 10^9$ , GC25-IFNd (图 6-c) 亲和常数为  $1.81 \times 10^{10}$ , GC40-IFNd (图 6-d) 亲和常数为  $5.49 \times 10^9$ 。抗体稀释 25 600 倍后亲和力开始下降, 稀释 100 000 倍后仍有微弱反应。

## 2.6 单克隆抗体免疫荧光分析

为了明确制备的单克隆抗体能否用于免疫荧光分析, 将 pcDNA3.4-*CiIFNa* 和 pcDNA3.4-*CiIFNd* 表达质粒转染至草鱼 CIK 细胞, 在 CIK 细胞中过量表达 *CiIFNa* 和 *CiIFNd*, 采用 FITC 标记的



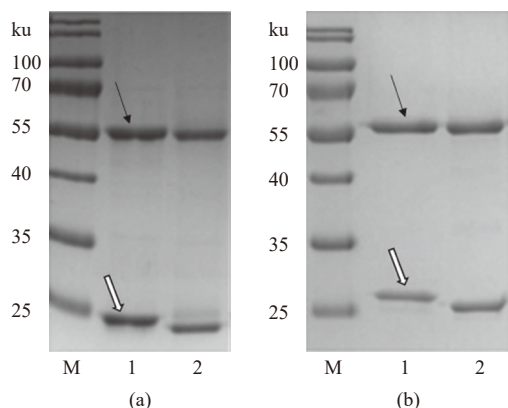


图5 SDS-PAGE 鉴定纯化后的抗体

(a) *CifNa* 抗体 SDS-PAGE 分析, M2. 蛋白质分子量标准, 1. GC10-IFNa 抗体, 2. GC12-IFNa 抗体; (b) *CifNd* 抗体 SDS-PAGE, M2. 蛋白质分子量标准, 1. GC25-IFNd 抗体, 2. GC40-IFNd 抗体; 实心箭头指示免疫球蛋白重链, 空心箭头指示免疫球蛋白轻链

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified antibodies

(a) SDS-PAGE analysis of *CifNa* antibodies, M2. protein molecular marker, 1. GC10-IFNa antibody, 2. GC12-IFNa antibody; (b) SDS-PAGE analysis of *CifNd* antibodies, M2. protein molecular marker, 1. GC25-IFNd antibody, 2. GC40-IFNd antibody; solid arrows and hollow arrows indicate immunoglobulin heavy chain and immunoglobulin light chain, respectively

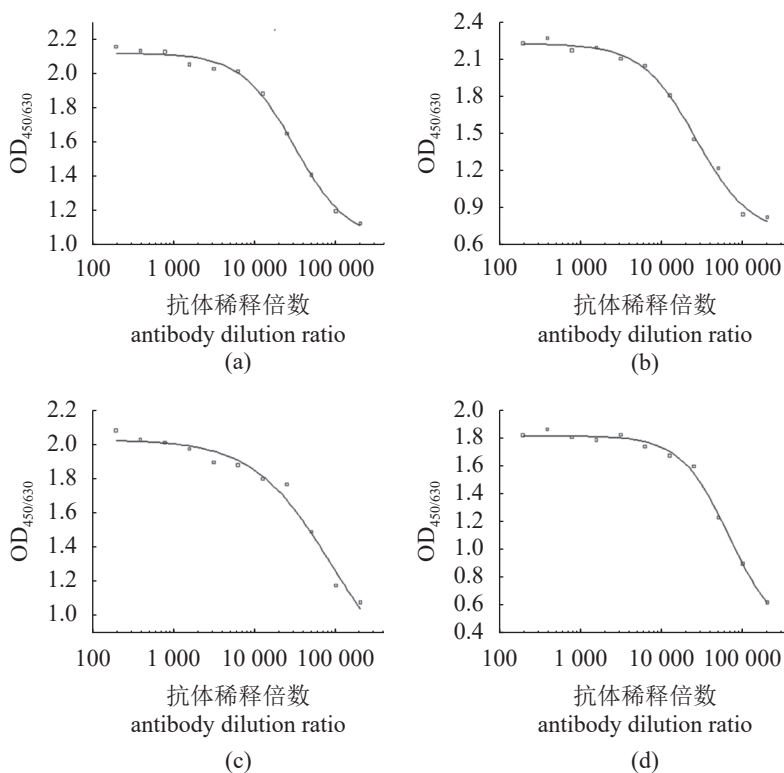


图6 抗体效价的ELISA测定

(a) GC10-IFNa 抗体效价, (b) GC12-IFNa 抗体效价, (c) GC25-IFNd 抗体效价, (d) GC40-IFNd 抗体效价

Fig. 6 Determination of antibody titers by ELISA

(a) GC10-IFNa antibody titer, (b) GC12-IFNa antibody titer, (c) GC25-IFNd antibody titer, (d) GC40-IFNd antibody titer

GC10-IFNa 和 GC25-IFNd 抗体对转染细胞进行直接免疫荧光检测, 结果显示, 在激光共聚焦显微镜 (63 $\times$ , Leica SP8) 下观察, 发现 2 株抗体均能检测到表达 *CifNa* 和 *CifNd* 的阳性细胞, 表达的 *CifNa* 和 *CifNd* 蛋白主要位于细胞质中, 但 *CifNa* 在细胞核中也有表达 (图版)。这些结果表明, GC10-IFNa 和 GC25-IFNd 可用于免疫荧光分析。

## 2.7 抗体特异性分析

草鱼和斑马鱼属于鲤科鱼类, 干扰素序列同源性较高<sup>[31]</sup>(表 4), *CifNa* 与 *DrIFN $\phi$ 1* (*DrIFNa*) 的相似性和一致性分别为 84.6% 和 73.1%, *CifNd* 与 *DrIFN $\phi$ 4* 的相似性和一致性分别为 87.5% 和 75.0%。为了验证草鱼抗体能否识别斑马鱼的同源干扰素蛋白, 将重组质粒 pcDNA3.4-*CifNa*、pcDNA3.4-*CifNd*、pcDNA3.1-*DrIFN $\phi$ 1* 和 pcDNA3.1-*DrIFN $\phi$ 4* 转染至 HEK293 细胞过量表达 *CifNa*、*CifNd*、*DrIFN $\phi$ 1* (*DrIFNa*) 和 *DrIFN $\phi$ 4* (*DrIFNd*) 真核重组蛋白, 阴性对照为转染空载质粒 pcDNA3.4, 用纯化后的 GC10-IFNa、GC12-IFNa、



表 4 *Ci*IFN $\alpha$ /IFN $\delta$  和 *Dr*IFN $\phi$ 1/IFN $\phi$ 4 蛋白顺序相似性 (左下) 和一致性 (右上)

Tab. 4 Sequence similarity (bottom left) and identity (top right) of *C. idella* IFN $\alpha$ /IFN $\delta$  and *D. rerio* IFN $\phi$ 1/IFN $\phi$ 4 (%)

| 基因<br>genes            | 1    | 2    | 3    | 4    |
|------------------------|------|------|------|------|
| <i>Ci</i> IFN $\alpha$ |      | 21.9 | 73.1 | 25.7 |
| <i>Ci</i> IFN $\delta$ | 47.7 |      | 28.6 | 75.0 |
| <i>Dr</i> IFN1         | 84.6 | 50.7 |      | 21.5 |
| <i>Dr</i> IFN4         | 47.2 | 87.5 | 45.8 |      |

GC25-IFN $\delta$ 、GC40-IFN $\delta$  抗体进行 Western blot 分析。结果显示, 草鱼 GC10-IFN $\alpha$  抗体能识别斑马鱼 IFN $\phi$ 1(IFN $\alpha$ ), 而 GC12-IFN $\alpha$  则不能识别 (图 7-a, b), 并且 GC12-IFN $\alpha$  检测到 2 个 *Ci*IFN $\alpha$  蛋白条带, 其中一条带比目的条带大 3 ku 左右, 这可能与 *Ci*IFN $\alpha$  糖基化有关, 但需要进一步证实。草鱼 GC25-IFN $\delta$  和 GC40-IFN $\delta$ (图 7-c, d) 抗体具有较强的特异性, 均不能识别草鱼 *Ci*IFN $\alpha$ 、斑马鱼 IFN $\phi$ 1(IFN $\alpha$ ) 和 IFN $\phi$ 4(IFN $\delta$ )。

3 讨论

I 型干扰素由病毒等病原微生物和干扰素诱生剂诱导细胞后所产生的细胞因子, 分泌后与相应的受体结合, 活化胞内信号传导通路, 具有抑制病毒复制、调节细胞增殖等免疫功能<sup>[32]</sup>, 此外, I 型干扰素也具有抗肿瘤、调节免疫力和激素分泌等功能<sup>[33]</sup>。研究表明, 鱼类 I 型干扰素具有保守的生物学功能, 其介导的抗病毒反应已得到广泛证实<sup>[26]</sup>。

哺乳类中几乎所有的有核细胞分泌 I 型干扰素, 但不同细胞类型产生干扰素的能力不同, 例如, 树突状细胞中 IFN $\alpha$  的表达量是其他细胞的 100 倍以上<sup>[34]</sup>, 这种情形也可能存在于鱼类中<sup>[14, 23, 35]</sup>。Zou 等<sup>[14]</sup>发现虹鳟 IFN $\alpha$ 1(IFN1) 和 IFN $\alpha$ 2(IFN2) 在 Poly(I:C) 刺激的原代头肾白细胞和成纤维细胞系 (RTG-2) 中均有表达, 而 IFN $\gamma$  仅在 Poly(I:C) 刺激的原代头肾白细胞中表达, 在成纤维细胞系中不表达<sup>[14]</sup>。斑马鱼肝细胞和中性粒细胞在感染 CHIKV 病毒 (Chikungunya virus) 后产生大量 IFN $\phi$ 1

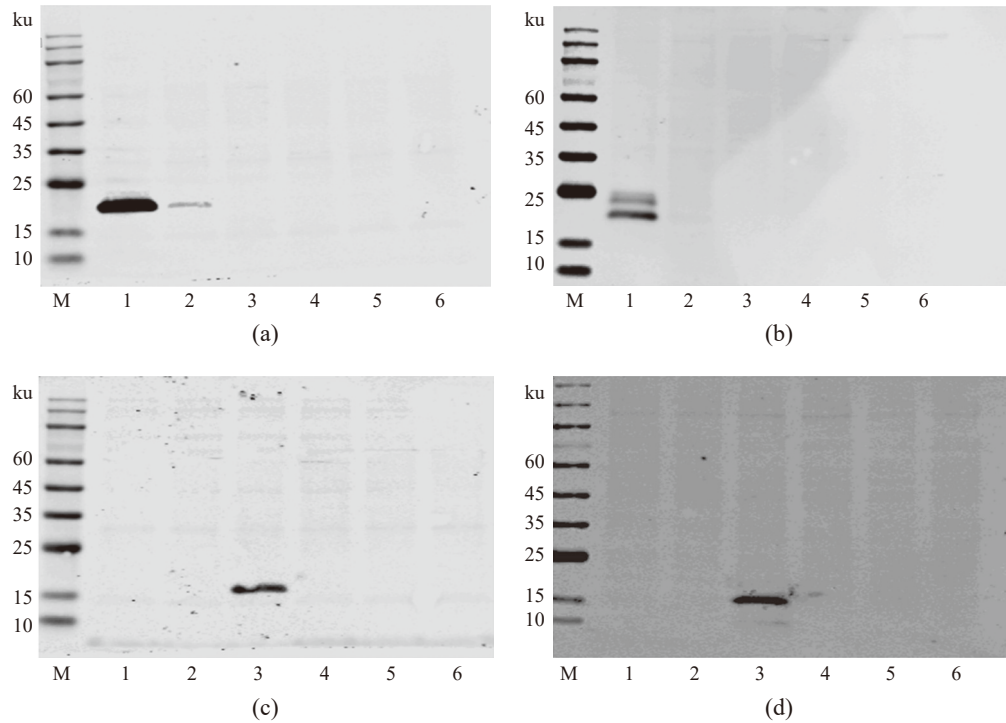
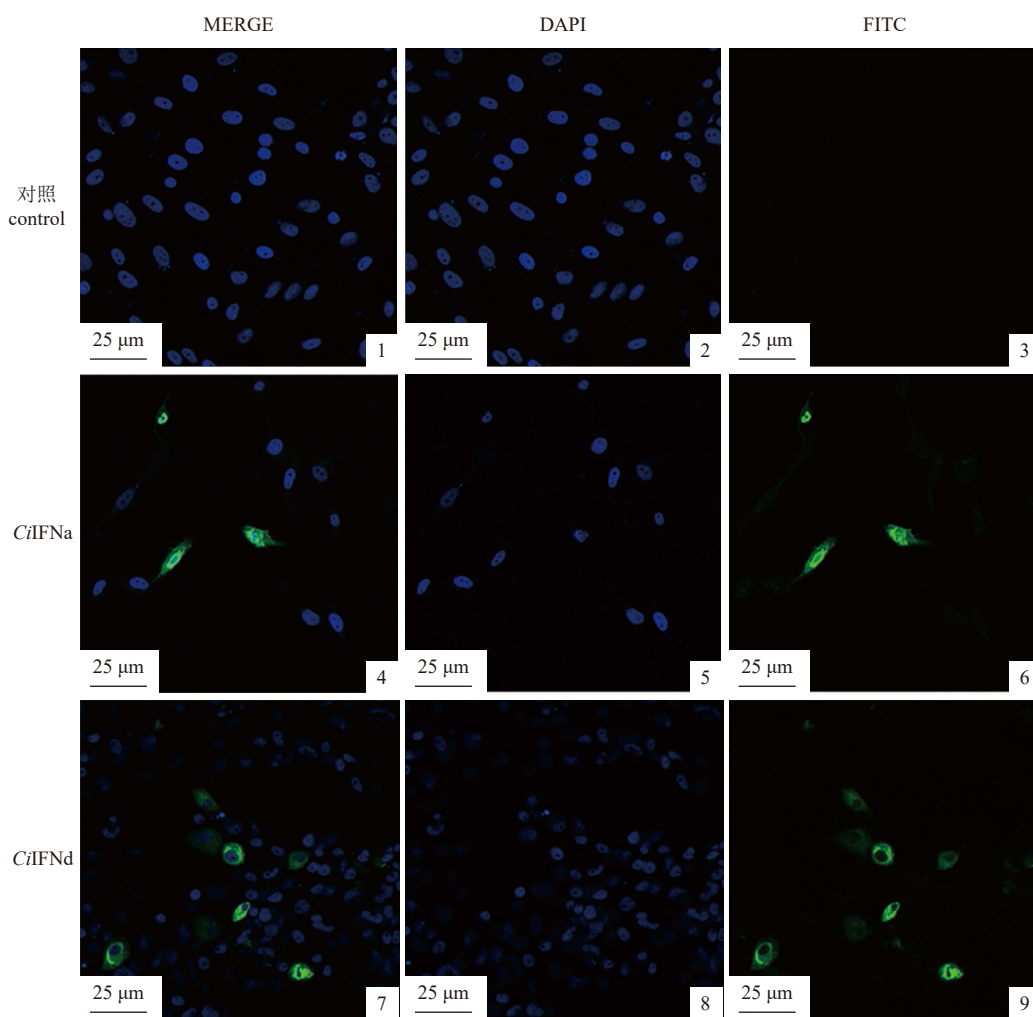


图 7 单克隆抗体特异性分析

(a) GC10-IFN $\alpha$ , (b) GC12-IFN $\alpha$ , (c) GC25-IFN $\delta$ , (d) GC40-IFN $\delta$ ; M. 蛋白质分子量标准, 1. pcDNA3.4-*Ci*IFN $\alpha$ , 2. pcDNA3.1-*Dr*IFN $\phi$ 1, 3. pcDNA3.4-*Ci*IFN $\delta$ , 4. pcDNA3.1-*Dr*IFN $\phi$ 4, 5. pcDNA3.4, 6. 空白对照

Fig. 7 Analysis of specificity of monoclonal antibodies

GC10-IFN $\alpha$ , (b) GC12-IFN $\alpha$ , (c) GC25-IFN $\delta$ , (d) GC40-IFN $\delta$ ; M. protein molecular marker, 1.pcDNA3.4-*Ci*IFN $\alpha$ , 2. pcDNA3.1-*Dr*IFN $\phi$ 1, 3. pcDNA3.4-*Ci*IFN $\delta$ , 4. pcDNA3.1-*Dr*IFN $\phi$ 4, 5. pcDNA3.4, 6. blank control



图版 CIK 细胞中 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 重组蛋白的免疫荧光检测

绿色为 *CiIFNa* 或 *CiIFNd* 蛋白；蓝色为细胞核

#### Plate Immunofluorescence detection of the recombinant *CiIFNa* and *CiIFNd* proteins in CIK cells

green indicates recombinant *CiIFNa* or *CiIFNd* protein; blue indicates cell nucleus

(IFNa)<sup>[35]</sup>。此外，Svingerud 等<sup>[23]</sup>采用荧光原位杂交 (FISH) 分析了大西洋鲑在 Poly(I:C) 和 R848 刺激后 I 型干扰素各家族成员的表达情况<sup>[23]</sup>，研究发现，IFNa 在所有组织中都有表达，而且 IFNa 阳性细胞在头肾和脾脏中最多，而 IFNc 阳性细胞主要位于血窦中，内皮细胞不表达 IFNc<sup>[23]</sup>。头肾、脾脏和鳃中同一细胞可表达 IFNa 和 IFNc。有意思的是，Poly(I:C) 刺激不诱导 IFNb 表达，然而，在 R848 刺激后 IFNb 和 IFNc 可在头肾和脾细胞中共表达。这些结果表明，鱼类 I 型干扰素家族成员具有不同的细胞来源和表达特征。综上所述，本研究制备的 IFNa 和 IFNd 单克隆抗体为明确 I 型干扰素不同成员的细胞来源以及它们在免疫反应中的血清浓度变化情况奠定基础，进一步推动

鱼类 I 型干扰素的深入研究。

单克隆抗体是由淋巴细胞分泌的一种仅针对某一特定抗原表位的抗体，具有特异性好、亲和力强等特点<sup>[36]</sup>，人类细胞因子的单克隆抗体已经被广泛应用在临床诊断和科学研究中，但是鱼类中报道很少。本研究利用原核表达系统制备高纯度 *CiIFNa* 和 *CiIFNd* 重组蛋白，并获得 *CiIFNa*、*CiIFNd* 各 2 株单克隆抗体，通过 ELISA、Western blot、免疫荧光等手段证明 4 株单克隆抗体均具有较好的特异性和较高的效价，*CiIFNa* 单克隆抗体特异识别 *CiIFNa*，但不与 *CiIFNd* 反应，同样，*CiIFNd* 单克隆抗体不识别 *CiIFNa*。而且，GC10-IFNa 抗体可与斑马鱼 IFN $\phi$ 1(IFNa) 发生交叉反应，但亲和力相对较弱。序列分析发现，*CiI*-

FN $\alpha$  与 DrIFN $\phi$ 1 具有较高的同源性, 序列相似性为 84.6%, 可能 GC10-IFN $\alpha$  抗体识别的抗原表位位于保守区段。与之相反, 虽然 CiIFN $\delta$  与 DrIFN $\phi$ 4 的序列相似性高达 87.5%, 但 CiIFN $\delta$  的 2 株抗体均不识别 IFN $\phi$ 4(DrIFN $\delta$ ), 提示 CiIFN $\delta$  识别的抗原表位可能位于非保守区段。

综上所述, 本研究制备了特异性较强的 CiIFN $\alpha$  和 CiIFN $\delta$  单克隆抗体, 为深入研究草鱼乃至其他鲤科鱼类干扰素系统奠定了基础。

感谢中国科学院武汉病毒研究所方勤老师提供草鱼草鱼肾细胞系 (CIK 细胞系)。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20047-20051.
- [2] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 202(1): 8-32.
- [3] Hertzog P J, Williams B R G. Fine tuning type I interferon responses[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2013, 24(3): 217-225.
- [4] Ivashkiv L B, Donlin L T. Regulation of type I interferon responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(1): 36-49.
- [5] Paludan S R, Bowie A G. Immune sensing of DNA[J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 870-880.
- [6] Goubau D, Deddouch S, Sousa C R E. Cytosolic sensing of viruses[J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 855-869.
- [7] Iwasaki A. A virological view of innate immune recognition[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 177-196.
- [8] Levy D E, Darnell Jr J E. STATs: Transcriptional control and biological impact[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(9): 651-662.
- [9] Stark G R, Darnell Jr J E. The JAK-STAT pathway at twenty[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 503-514.
- [10] MacMicking J D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(5): 367-382.
- [11] Schoggins J W, Wilson S J, Panis M, *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 481-485.
- [12] Zou J, Secombes C J. Teleost fish interferons and their role in immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376-1387.
- [13] Gan Z, Chen S N, Huang B, *et al.* Fish type I and type II interferons: Composition, receptor usage, production and function[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 773-804.
- [14] Zou J, Tafalla C, Truckle J, *et al.* Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(6): 3859-3871.
- [15] Sun B J, Robertsen B, Wang Z Q, *et al.* Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(4): 547-558.
- [16] Zou J, Gorgoglione B, Taylor N G H, *et al.* Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: Characterization of the IFN locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups[J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 193(5): 2273-2286.
- [17] Liao Z W, Wan Q Y, Su J G. Bioinformatics analysis of organizational and expressional characterizations of the IFNs, IRFs and CRFBs in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 61: 97-106.
- [18] Ding Y, Ao J Q, Huang X H, *et al.* Identification of two subgroups of type I IFNs in perciform fish large yellow croaker *Larimichthys crocea* provides novel insights into function and regulation of fish type I IFNs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 343.
- [19] Chang M X, Nie P, Collet B, *et al.* Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts[J]. *Immunogenetics*, 2009, 61(4): 315-325.
- [20] Hamming O J, Lutfalla G, Levraud J P, *et al.* Crystal structure of Zebrafish interferons I and II reveals conservation of type I interferon structure in vertebrates[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(16): 8181-8187.

- [21] Collet B, Secombes C J. Type I-interferon signalling in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 389-397.
- [22] Langevin C, Aleksejeva E, Passoni G, *et al.* The antiviral innate immune response in fish: Evolution and conservation of the IFN system[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(24): 4904-4920.
- [23] Svingerud T, Solstad T, Sun B J, *et al.* Atlantic Salmon Type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: Evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues[J]. *The Journal of Immunology*, 2012, 189(12): 5912-5923.
- [24] Rao Y L, Wan Q Y, Yang C R, *et al.* Grass carp Laboratory of Genetics and Physiology 2 serves as a negative regulator in Retinoic Acid-Inducible Gene I- and Melanoma Differentiation-Associated Gene 5-mediated antiviral signaling in resting state and early stage of Grass Carp Reovirus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 352.
- [25] Qin Y T, Sun Z S, Wang W, *et al.* Characterization of CD3 $\gamma$  $\delta^+$  cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103791.
- [26] 田佳音. 斑马鱼 I 型干扰素和肿瘤坏死因子 (TNF $\alpha$ ) 的表达和功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- Tian J Y. Expression and function of zebrafish type I interferon and tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [27] 霍华德 G C, 凯瑟 M R. 抗体制备及使用实验指南 [M]. 张建民, 章静波, 陈实平, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2020.
- Howard G C, Kaser M R. Making and Using Antibodies: A Practical Handbook[M]. Zhang J M, Zhang J B, Chen S P, trans. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2020 (in Chinese).
- [28] Kao K N, Michayluk M R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts[J]. *Planta*, 1974, 115(4): 355-367.
- [29] 陈文龙. 抗牛病毒性腹泻病毒 Erns 蛋白单克隆抗体制备及鉴定 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.
- Chen W L. Preparation and identification of monoclonal antibody against erns protein of bovine viral diarrhea virus[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [30] 王伟. 草鱼白细胞介素-15(IL-15) 及其受体 IL-2R $\beta$  的鉴定和功能分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- Wang W. Identification and functional analysis of interleukin-15 (IL-15) and IL-2R $\beta$  in grass carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [31] Kitao Y, Kono T, Korenaga H, *et al.* Characterization and expression analysis of type I interferon in common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(13): 2548-2556.
- [32] Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(4): 231-242.
- [33] Reizis B, Bunin A, Ghosh H S, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells: Recent progress and open questions[J]. *Annual Review of Immunology*, 2011, 29: 163-183.
- [34] Liu Y J. IPC: Professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors[J]. *Annual Review of Immunology*, 2005, 23: 275-306.
- [35] Palha N, Guivel-Benhassine F, Briolat V, *et al.* Real-time whole-body visualization of Chikungunya Virus infection and host interferon response in zebrafish[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(9): e1003619.
- [36] Brüggemann M, Osborn M J, Ma B, *et al.* Human antibody production in transgenic animals[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2015, 63(2): 101-108.



## Expression of recombinant proteins and preparation of monoclonal antibodies for IFN $\alpha$ and IFN $\delta$ in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WANG Zixuan<sup>1</sup>, JIA Zhao<sup>1</sup>, WU Kaizheng<sup>1</sup>, ZHU Xiaozhen<sup>1</sup>,  
WANG Junya<sup>1</sup>, FENG Hao<sup>2</sup>, ZOU Jun<sup>1\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish,  
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** To understand the synthesis, secretion and immune functions of type I interferons (IFN) in *Ctenopharyngodon idella*, *CiIFN $\alpha$*  and *CiIFN $\delta$*  were expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) cells and purified. The mature peptides of *CiIFN $\alpha$*  and *CiIFN $\delta$*  were cloned into pET-21d and pEHISTEVb expression vectors, respectively, and transformed in *E. coli* Rosetta cells. The recombinant proteins were expressed as inclusion bodies after IPTG induction. Following denaturation with guanidine hydrochloride, renaturation and concentration, the recombinant proteins were purified by size exclusion chromatography and used for immunization of mice. Hybridoma cells were obtained using the PEG method and injected into the abdominal cavity of mice to generate ascites. Four monoclonal antibodies of *CiIFN $\alpha$*  and *CiIFN $\delta$*  (2 antibodies each) were purified, and characterized by SDS-PAGE, ELISA, Western blot and immunofluorescence assay. It has been shown that the monoclonal antibodies produced had good specificity and high titers against the antigens and could specifically recognize recombinant proteins expressed in *E. coli* and eukaryotic cells. The *CiIFN $\alpha$*  antibodies did not react with *CiIFN $\delta$*  and vice versa. Taken together, the *CiIFN $\alpha$*  and *CiIFN $\delta$*  monoclonal antibodies prepared in this study may provide the basis for further in-depth study of the cellular sources and protein expression profiles of IFNs in grass carp.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; interferon; cytokine; monoclonal antibody; recombinant protein

**Corresponding author:** ZOU Jun. E-mail: jzou@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (32030112)