

扬州鹅 IL-4 蛋白原核表达及其多克隆抗体制备

杜玉艳¹, 柴文娟², 江慧¹, 郭旺¹, 张钰¹, 张杨¹, 徐琪¹, 陈国宏^{1*}

(1. 扬州大学动物科学技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 常州市动物疫病预防控制中心, 江苏常州 213002)

摘要: 白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL-4) 是一种调节巨噬细胞极化的关键多功能性细胞因子, 在鹅抗病毒免疫中发挥着重要作用。为制备抗鹅白细胞介素 4 (IL-4) 的多克隆抗体, 本研究首先以从扬州鹅脾脏组织中获取的 cDNA 为模板, 通过聚合酶链式反应扩增、克隆扬州鹅 IL-4 基因, 并将该基因克隆到原核表达载体 pGEX-6P-1 中, 经测序验证正确后将其命名为 pGEX-6P-1-geese-IL-4。将 pGEX-6P-1-geese-IL-4 表达质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 分别用 0.2、1、5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 在 16℃ 和 37℃ 下诱导表达。SDS-PAGE 和 Western Blot 结果均显示: 在 0.2 mol/L IPTG、16℃ 条件下诱导 20 h 可高效表达为 35 kDa 鹅 IL-4 融合蛋白。随后, 用纯化后的扬州鹅 IL-4 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠 8 次, 采血验证多克隆抗体产生情况。Western Blot 结果表明, 所制备的抗体能特异性检测鹅 IL-4 融合蛋白, 证明抗体制备成功。本研究为进一步研究鹅 IL-4 蛋白的免疫功能奠定了基础。

关键词: 扬州鹅; 白细胞介素 4; 蛋白纯化; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S835.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250324-01

扬州鹅是我国自主培育的优良鹅种, 具有广泛的养殖规模和良好的经济价值。随着养鹅业的规模化发展, 疾病防控成为制约产业发展的关键因素。深入了解扬州鹅的免疫机制, 对于开发有效的免疫防治策略至关重要。

白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL-4) 是一种具有多种生物学功能的细胞因子, 分子量大约为 18 kDa^[1]。IL-4 主要由 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞产生, 被认为是调节过敏反应和炎症的重要因素之一, 同时也在免疫反应、细胞信号传导以及抗体类转换中扮演重要角色^[2-3]。作为一种关键的细胞因子, IL-4 在免疫细胞的调节过程中发挥着核心作用。IL-4 已被证实参与巨噬细胞极化、促进 B 细胞增殖分化以及免疫球蛋白类别转换中具有不可或缺的功能^[4-5]。例如, IL-4 通过加强 B 细胞与 T 细胞之间的相互作用, 促进体液免疫

应答, 尤其是促进由 IgE 介导的免疫应答反应的发生^[6]。而 IL-4 激活 B 细胞产生的抗体主要是 IgG1 和 IgE, 是机体免疫的重要调节因子^[7]。此外, IL-4 还具有促进淋巴细胞增殖的活性, 在一些过敏反应性疾病的发病过程中发挥着重要作用^[8]。

目前, 哺乳动物 IL-4 的功能机制研究比较成熟, 相关成果也充分揭示了其在免疫稳态维持、过敏反应调节以及抗肿瘤免疫中的复杂机制^[9-10]。这些研究为揭示禽类病毒感染免疫规律以及禽病的免疫防控提供了理论基础^[11]。相较于哺乳动物, 禽类 IL-4 的研究起步较晚且进展相对缓慢, 主要集中在鸡、鸭等少数品种上^[12-14]。关于扬州鹅 IL-4 的相关研究尚处于起步阶段。已有研究表明, 鹅感染小鹅瘟病毒后, 鹅的免疫组织中多种细胞因子 (如 IL-8、IL-18) 的表达水平发生变化^[15-16]。在病毒感染过程中, IL-4 的表达会因免疫抑制状态的不同而有所变化。本研究成功构建了扬州鹅 IL-4 的原核表达载体, 并在此基础上制备了其多克隆抗体。这一研究成果为深入探讨 IL-4 蛋白在病毒感染免疫反应中的作用机制奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 扬州鹅脾脏组织 cDNA、原核表达载

收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2025-04-21

资助项目: 常州市科学技术局农业科技支撑计划 (CE20232034)

作者简介: 杜玉艳 (2001-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传育种与繁殖, E-mail: 1764946509@qq.com

* 通信作者: 陈国宏 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事畜禽遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

体 pGEX-6p-1、氨苄青霉素、大肠杆菌 BL21 (DE) 均为本实验室提供, 质粒小提试剂盒 (DP103)、蛋白质分子质量 Marker 均为天根生化科技有限公司提供; 考马斯亮蓝染色液、GST 标签蛋白纯化试剂盒 (耐变性剂型) 均为碧云天生物科技有限公司提供; 限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 均为赛默飞世尔科技公司提供; 乳化和弗氏佐剂、弗氏不完全佐剂均为扬州必帮生物技术有限公司提供; IPTG 诱导剂为北京索莱宝科技有限公司提供。

1.2 扬州鹅 IL-4 原核表达载体构建 依据 GenBank 公布的鹅 *IL-4* 基因序列 (XM-013175717.2) 设计合成引物, 具体引物序列如下: 上游引物为 5'-GGATCCATGAGCATCTCTTCTCCGTC-3', 其中加入了 *Bam*HI 酶切位点 (下划线部分为酶切位点); 下游引物为 5'-GAATTCTACAAATTCTCTTCGCTACT-3', 加入了 *Eco*RI 酶切位点 (下划线部分为酶切位点)。以鹅脾脏组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系共 20 μ L: 2 $\times$ PCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA (50~1 000 ng/ μ L) 1 μ L, RNase-Free ddH₂O 7 μ L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带, -20 $^{\circ}$ C 储存。将 pGEX-6p-1-goose-IL4 原核表达载体经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 将载体与目的片段进行 *Exnase*II 同源重组酶连接, 将连接的产物转化入 BL21, 转化后的 BL21 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜, 挑取单菌落培养。

1.3 扬州鹅 IL-4 融合蛋白表达诱导条件摸索 取 pGEX-6p-goose-IL4 质粒转化菌 100 μ L, 加入到含有氨苄青霉素抗性的 5 mL LB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜; 分别加入 2、10、50 μ L 的 IPTG (终浓度为 0.2、1、5 mol/L), 于 16 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 温度下分别诱导 20 h 和 5 h, 通过 10% SDS-PAGE 电泳来分析蛋白的表达状况, 从而确定菌体的最佳培养温度、浓度以及培养时间, 最终选择菌体合适的诱导条件进行蛋白表达。

1.4 扬州鹅 IL-4 融合蛋白诱导和纯化 将含有 pGEX-6p-goose-IL-4 重组质粒以及空载体的 BL21 阳性菌, 按照 1:1 000 的比例分别接种到含有氨苄青霉素抗性的培养基里, 在培养箱中以转速 225 rpm、温度为 37 $^{\circ}$ C 条件

下进行振荡培养。随后加入 IPTG 诱导剂, 使其终浓度达到 0.2 mol/L, 再在转速 150 rpm、温度 16 $^{\circ}$ C 条件下进行诱导培养 20 h, 后收集菌液, 并利用碧云天蛋白纯化试剂盒所提供的方法进行蛋白纯化操作。

1.5 Western Blot 首先按照实验室的标准流程, 利用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分析。之后, 采用湿法将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。转印完成后, 将 PVDF 膜放置在摇床上, 用含有 5% 脱脂奶粉的溶液封闭 1 h 45 min, 接着用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次, 每次 5 min。随后, 将膜加入到稀释 1 000 倍的 GST 单克隆抗体溶液中, 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。再次用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次, 每次 5 min, 然后在二抗中孵育 1 h 15 min, 用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次, 每次 5 min。洗涤结束后, 将膜放入成像仪中, 避光条件下滴加 100 μ L ECL 显色液进行曝光。

1.6 考马斯染色 通过 1.5 中的实验验证, 重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 采用考马斯亮蓝染色法检测其纯度。通过配制 10% 下层胶和 5% 上层胶, 取全部样品, 上样至凝胶中, 90 V 电泳 20 min, 后改 120 V 35 min 继续电泳至结束。凝胶取出后, 切掉上层的胶部分, 放入盒子中, 然后加入 15 mL 考马斯亮蓝染色液。在水平旋转仪上进行染色 1 h, 转速为 60 rpm, 结束后将考马斯染色液回收, 后用超纯水洗膜 3 次, 每次 10 min。

1.7 扬州鹅 IL-4 蛋白多克隆抗体制备 将经过纯化处理的蛋白与弗氏佐剂按照等体积比例进行混合, 确保充分乳化, 随后通过腹腔注射的方式将其注入 7~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠体内, 每只注射 180 μ L, 每次免疫间隔时间为 7 d, 第 2~4 次免疫, 使用弗氏不完全佐剂, 其余步骤相同; 第 5~6 次免疫, 用获取的蛋白抗原进行直接注射, 每只注射 250 μ L, 取一只小鼠进行眼球取血, 分离血清, 进行 Western Blot 验证抗体效果, 若小鼠没死可放回笼中继续饲养, 1 周后, 再进行 2 次免疫, 2 次免疫时间间隔 1 周, 最终经过共 8 次免疫, 全部小鼠进行眼球取血, 分离血清, 并分装保存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2 结果

2.1 扬州鹅 IL-4 原核表达载体构建结果 利用常规 PCR 方法扩增获得鹅源 *IL-4* 基因, 大小为 413 bp (图 1A)。然后通过同源重组方法将 *IL-4* 基因克隆入 pGEX-6p-1 载体中, 获得重组原核表达质粒 pGEX-

6p-goose-IL4, 测序结果表明无碱基突变, 方向正确且阅读框完整, 说明已成功构建 *IL-4* 原核表达重组质粒 pGEX-6p-goose-IL-4 (图 1B)。

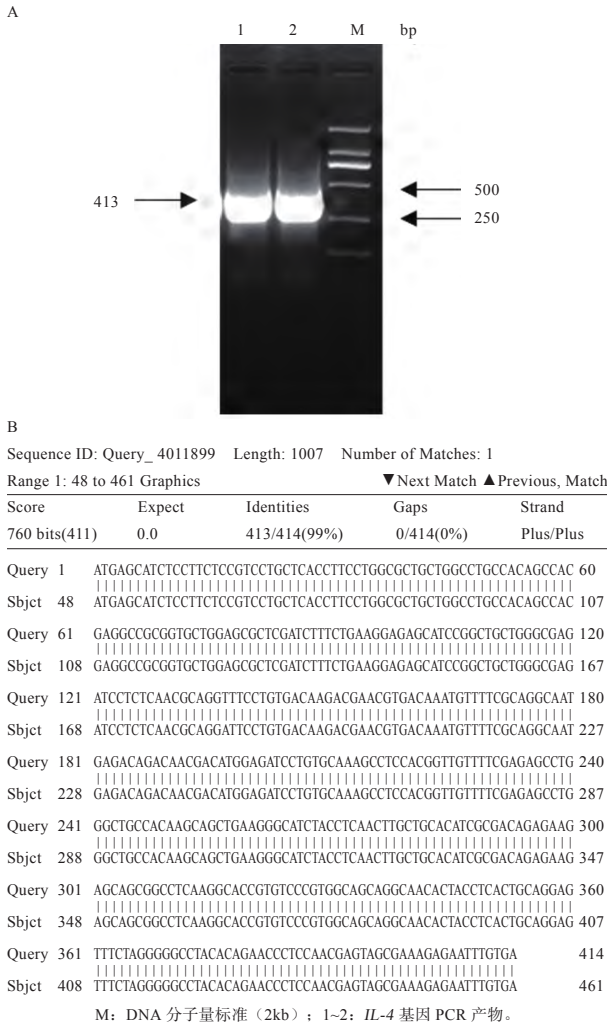


图 1 *IL-4* 基因 PCR 扩增结果 (A) 和重组质粒构建结果 (B)

2.2 扬州鹅 *IL-4* 融合蛋白表达诱导条件摸索对比结果 通过温度为 37℃ 和 16℃, IPTG 浓度以 0、0.2、1、5 mol/L 为条件进行摸索对比, 经 SDS-PAGE 分析诱导后的蛋白, 在约 35 kDa 处呈现出特异性条带 (图 2), 符合预期结果。Western Blot 验证结果也显示, 在大约 35 kDa 位置有条带出现 (图 3)。

2.3 扬州鹅 *IL-4* 融合蛋白诱导和纯化结果 对经过 16℃、20 h 诱导后的蛋白进行纯化处理并分析, 诱导表达的重组菌经超声破碎处理后, 取其上清液, 再用洗脱液进行洗脱操作。通过考马斯亮蓝染色法对蛋白纯化结果进行分析, 结果显示 (图 4), *IL-4* 重组蛋白的纯化效果较为理想, 在 35 kDa 条带的位置呈现出一条清晰

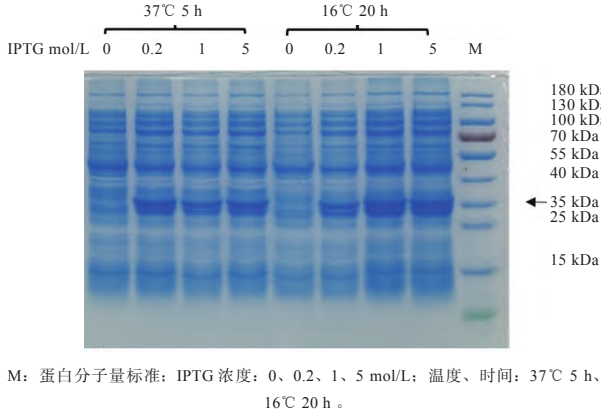


图 2 pGEX-6P-goose-IL-4IPTG 诱导表达

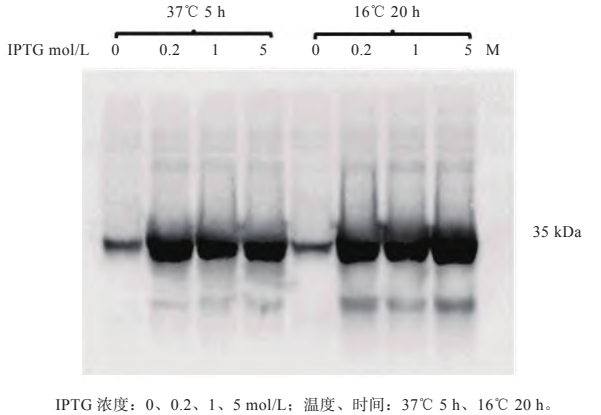


图 3 pGEX-6P-goose-IL-4 蛋白诱导 Western Blot 结果

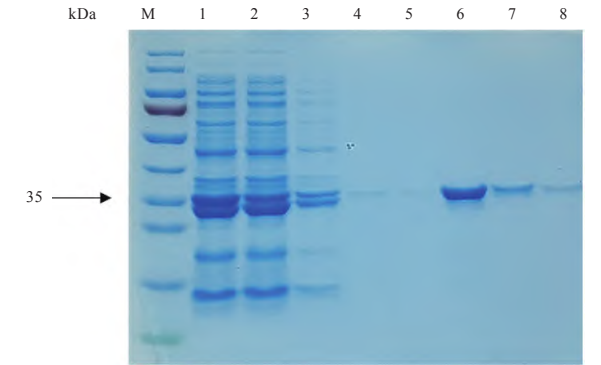
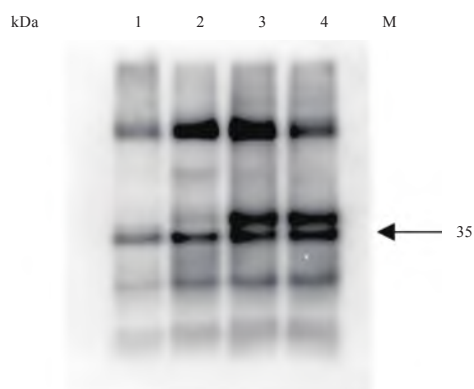


图 4 考马斯染色分析蛋白纯化结果

可见的条带。

2.4 扬州鹅 *IL-4* 蛋白多克隆抗体制备鉴定结果 以 *IL-4* 蛋白为抗原, 免疫后的小鼠血清做一抗, 进行 Western Blot 检测, 结果表明, 所制备的多克隆抗体能够特异性地识别 *IL-4* 蛋白, 并且在大约 35 kDa 的位置检测到了特异性条带 (图 5), 这一结果与预期一致, 从而证实了所获得的多克隆抗体具有良好的特异性。



1: 阴性对照; 2-4: IL-4 蛋白; M: 蛋白分子量标准。

图 5 多克隆抗体 Western Blotting 鉴定

3 讨 论

本研究成功构建了扬州鹅 IL-4 蛋白的原核表达载体 pGEX-6p-1-goose-IL4, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实现了高效表达; 扬州鹅 IL-4 融合蛋白分子量约为 35 kDa, 与预期大小相符, 并且通过优化 IPTG 浓度、诱导时间和温度等表达条件, 获得了较高的蛋白表达量。在 0.5 mol/L IPTG、16℃ 诱导 20 h 的条件下, 扬州鹅 IL-4 融合蛋白的表达量最佳, 这为后续大规模制备扬州鹅 IL-4 融合蛋白提供了可行的方案。

尽管在其他禽类上 (如鸡、鸭等物种) 已经开展了 IL-4 的原核表达和抗体制备^[12-14], 但目前对于扬州鹅 IL-4 抗体制备以及生物学功能的研究仍较为有限。本研究通过纯化扬州鹅 IL-4 融合蛋白后免疫小鼠获得了能够特异性地识别扬州鹅 IL-4 蛋白的多克隆抗体。此多克隆抗体的成功制备, 为后续研究扬州鹅 IL-4 的生物学功能以及感染免疫调节机制提供了重要的工具。研究表明, 禽类 IL-4 在调节巨噬细胞极化、免疫细胞增殖、分化以及细胞因子分泌等生物学过程中扮演着关键作用^[17-19]。利用本研究制备的多克隆抗体, 今后可深入探索扬州鹅 IL-4 在体内的表达分布规律以及与其他感染免疫相关分子的互作机制。此外, 还可通过构建 IL-4 蛋白功能获得和缺失模型, 进一步研究 IL-4 在扬州鹅免疫应答过程中的具体功能和作用机制^[18-20]。

尽管本研究取得了一定的进展, 但 IL-4 蛋白的具体应用仍然存在一些问题。例如, 其在体内的具体作用途径和效果需要进一步明确。此外, 不同病毒感染下 IL-4 的作用机制也可能存在差异, 这些都需要通过更多的实验进行深入探究。

4 结 论

本研究成功表达纯化 IL-4 蛋白并制备了扬州鹅 IL-4 多克隆抗体, 为后续开展鹅 IL-4 功能机制研究提供了基础。

参考文献:

- [1] Howard M, Farrar J, Hilfiker M, *et al.* Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2[J]. *J Exp Med*, 1982, 155(3): 914-923.
- [2] Paul W E. Interleukin-4: a prototypic Immunoregulatory lymphokine[J]. *Blood*, 1991, 77(9): 1859-1870.
- [3] Chtanova T, Mackay C R. T cell effector subsets: Extending the Th1/Th2 paradigm[J]. *Adv Immunol*, 2001, 78: 233-266.
- [4] Gao S, Zhou J, Liu N, *et al.* Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 85: 131-139.
- [5] Phu T A, Ng M, Vu N K, *et al.* IL-4 polarized human macrophage exosomes control cardiometabolic inflammation and diabetes in obesity[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(6): 2274-2297.
- [6] Muller U, Steinhoff U, Reis L F, *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense[J]. *Science*, 1994, 264(5167): 1918-1921.
- [7] Hässig A, Kremer H, Liang W X, *et al.* The role of the Th-1 to Th-2 shift of the cytokine profiles of CD4 helper cells in the pathogenesis of autoimmune and hypercatabolic diseases[J]. *Medical Hypotheses*, 1998, 51(1): 59-63.
- [8] Mosmann T R, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more[J]. *Immunology Today*, 1996, 17(3): 138-146.
- [9] Van Dyken, Steven J, Locksley, *et al.* Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 317-343.
- [10] Ho I C, Miaw S C. Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases[J]. *Adv Exp Med Bio*, 2016, 941: 31-77.
- [11] Paul W E. History of Interleukin-4[J]. *Cytokine*, 2015, 75(1): 3-7.
- [12] Khajeh H, Bahari A, Lagzian M, *et al.* Functional and key gene expression analyses of chicken monocyte-derived dendritic cells with recombinant Interleukin 4[J]. *Iran J Allergy Asthm*, 2016, 15(6): 508-514.
- [13] Wondimu A, Veit M, Kohn B, *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of the *Canis familiaris* interleukin-4[J]. *Cytokine*, 2001, 16(3): 88-92.
- [14] Fernandez C P, Afrin F, Flores R A, *et al.* Identification of duck IL-4 and its inhibitory effect on IL-17A expression in *R. anatipestifer*-stimulated splenic lymphocytes[J]. *Mol Immunol*, 2018, 95: 20-29.
- [15] Xu Q, Chen Y, Zhao W, *et al.* Infection of goose with genotype VIIId newcastle disease virus of goose origin elicits strong immune responses at early stage[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1587.
- [16] 櫻桃. GPV 感染鹅免疫组织中病毒的检测及免疫抑制的研究

武定鸡 FABP6 基因克隆及生物信息学分析

邱文才¹, 苏航¹, 杨明华¹, 赵素梅¹, 潘洪彬¹, 黄英^{1*}, 李永能^{2*}

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南省动物营养与饲料重点实验室, 云南昆明 650201;
2. 云南农业大学组织部, 动物医学院, 云南昆明 650201)

摘要: 本研究旨在克隆武定鸡脂肪酸结合蛋白 6 (FABP6) 基因 CDS 区序列并进行生物信息学分析, 为后续研究 FABP6 基因对武定鸡脂肪代谢与沉积的影响提供参考。以武定鸡为试验对象, 设计 FABP6 引物、提取总 RNA、反转录、PCR 扩增并克隆其编码区序列, 并进行同源性比对及系统进化树构建; 运用生物信息学软件对其编码蛋白的理化性质、亲/疏水性、跨膜区、信号肽、修饰结构、保守结构域及二、三级结构进行预测。结果显示: 武定鸡 FABP6 基因 CDS 序列全长 387 bp, FABP6 蛋白等电点 7.82, 平均疏水指数 -0.566, 为亲水蛋白, 不存在信号肽和跨膜区, 主要定位于细胞质。FABP6 蛋白被 14 个磷酸化位点修饰, 无糖基化位点, 主要由 α -螺旋、延伸链和无规卷曲构成。武定鸡 FABP6 与原鸡、火鸡、珍珠鸡、雪鸡、环颈雉鸡、鹌鹑、鸿雁、棕硬尾鸭、天鹅和绿头鸭基因同源性分别为 99.2%、96.6%、96.4%、96.1%、96.1%、95.9%、90.2%、89.7%、89.7% 和 89.4%。FABP6 蛋白与 FABP2、FABP3、FABP4、FABP5、FABP7、FABP9、NR1H4、RXRA、SLC10A2 和 SNX24 蛋白存在互作关系。本研究明确了 FABP6 基因在武定鸡脂肪代谢与沉积中的核心作用, 为其分子机制的深入解析奠定了理论基础, 也为我国优质地方鸡种的肉质改良与高效新品种培育提供了候选基因。

关键词: 武定鸡; FABP6 基因; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20241219-03

脂肪酸 (Fatty Acid, FA) 不仅是一种基础营养物质, 也是细胞代谢活动的重要调节物之一^[1-2]。脂肪酸由于其高度疏水性, 通常不以游离状态存在和运输, 而细胞内的脂肪酸结合蛋白能够与这些疏水分子结合, 以确保

脂质结合、转运和代谢的顺利进行^[3-4]。脂肪酸结合蛋白家族 (Fatty Acid Binding Proteins, FABPs) 是一种小型且高度保守的细胞质蛋白家族^[5]。它们作为细胞内的脂肪酸载体, 能够与脂肪酸和其他疏水性配体结合, 并负责将这些脂肪酸运输到脂质氧化与合成的特定位置, 对动物体内脂肪酸的代谢和沉积具有重要影响^[6]。脂肪酸结合蛋白 6 (Fatty Acid Binding Protein 6, FABP6) 是 FABPs 的成员之一, 又称为回肠型脂肪酸结合蛋白 (Ileum Fatty Acid Binding Protein, Ileum-FABP, IL-FABP), 在小肠远段被发现和分离, 可以在肠道上皮细胞中与脂肪酸进行结合和转运^[7]。研究表明, FABP6

收稿日期: 2024-01-01; 修回日期: 2025-02-01
资助项目: 国家十四五重点研发计划项目 (2022YFD1601905)
作者简介: 邱文才, 男, 云南昆明人, 硕士, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: qiuqiudx@163.com
* 通信作者: 黄英, 女, 云南陆良人, 高级实验师, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: 410457491@qq.com; 李永能, 男, 云南师宗人, 高级实验师, 主要从事动物营养与健康养殖研究, E-mail: lyn77@vip.sina.com

究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
[17] Tan F, Zhang L, Yin L, et al. Immune synergistic mechanism of recombinant plasmid adjuvant containing chicken IL-4 and IL-2 fusion genes on chicken coccidia live vaccine[J]. Poult Sci, 2024, 103(1): 103204.
[18] Zheng L, Zhang L, Tan F, et al. Prevention and control of chicken coccidiosis construction of recombinant Lactococcus lactis expressing chicken IL-4 and IL-2 fusion protein and its-immune synergistic effect on chicken coccidia live vaccine[J].

Poult Sci, 2023, 102(4): 102530.
[19] Liu W, Dong C, Liu X. The role of IL4I1 in immunoregulation: An update[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2021, 37(1):79-83.
[20] Linehan L A, Warren W D, Thompson P A, et al. STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination[J]. J Immunol, 1998, 161(1): 302-310.

(责任编辑: 赵楠)