中国水产科学 2024 年 7 月, 31(7): 754–765
Journal of Fishery Sciences of China

研究论文

DOI: 10.12264/JFSC2024-0031

大口黑鲈 NLRP3 蛋白多克隆抗体的制备及初步应用

陈振威, 江藕, 唐伟俊, 姜明旭, 王怀池, 简宇清, 王欢, 郑菲菲, 王庆超

华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070

摘要: NLRP3 作为经典的模式识别受体, 与 ASC 和 pro-caspase1 等蛋白组成 NLRP3 炎症小体, 是鱼类细胞焦亡的主要激活途径。为深入探究大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)中 NLRP3 相关功能, 以大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) cDNA 为模板扩增 *Msnlrp3* 区段并构建 pET-32a-MsNLRP3 原核重组质粒, 随后将上述重组质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞后以 0.8 mmol/L 的 IPTG 于 16 ℃过夜诱导重组蛋白的表达。通过亲和层析纯化对获得的上清蛋白液进行纯化, 并以 SDS-PAGE 和质谱分析法对获得的 MsNLRP3 重组蛋白进行鉴定, 从而确认 MsNLPR3 原核表达系统构建成功。将上述纯化的 MsNLRP3 蛋白分别免疫日本大耳兔(1 只)和 Balb/C 小鼠(3 只)制备多克隆抗体, 通过 ELISA 和 Western blotting 法检测抗体的效价和特异性。结果表明, 免疫后获得的 4 种抗血清能特异性识别 NLRP3 重组蛋白和大口黑鲈内源性蛋白, 表现出单一而清晰的目的条带, 且分子量大小与预期一致; 同时兔源和鼠源抗血清效价分别为 1∶10240 K 和 1∶1024 K。为验证抗体的应用效果, 首先构建柱状黄杆菌浸泡感染大口黑鲈的模型, 大口黑鲈鳃表现出明显的组织病理学变化; 应用本研究制备的多克隆抗体进行蛋白质印迹分析, 检测到鳃中 NLRP3 蛋白水平在细菌感染后显著上调。本研究制备的 MsNLRP3 多克隆抗体为未来开展大口黑鲈 NLRP3 蛋白的功能研究提供了重要的基础。

关键词: 大口黑鲈; NLRP3; 原核表达; 重组蛋白; 质谱; 多克隆抗体

中图分类号: S941 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005−8737−(2024)07−0754−12

作为一种新的程序性细胞死亡形式, 细胞焦亡是由宿主细胞感知到病原体感染和其他危险信号后由焦孔素(gasdermin, GSMD)执行的炎症细胞死亡, 主要特征有 GSMD 介导的孔形成、细胞肿胀破裂以及炎性细胞介质的释放。哺乳动物中细胞焦亡根据执行蛋白和激活途径的差异一般可以分为 4 种途径, 而目前有关鱼类中细胞焦亡多集中于依赖 NLRP3 炎症小体的诱导途径。除鲤科外的多数硬骨鱼类中 NLRP3 炎症小体是由 NLRP3 蛋白通过 PYD-PYD 结构域结合 ASC 蛋白, 再通过 ASC 蛋白的 CARD 结构域结合 pro-caspase1 蛋白后形成的炎症小体复合物[1]。NLRP3 炎症小体将 caspase1 前体活化后, 可切割 GSDME 蛋白并释放其 N 端在细胞膜形成穿孔导致内容物释放引起细胞快速破裂和溶解[2], 也可将 IL-1β 和 IL-18 的前体裂解成活性形式, 并通过膜孔释放到胞外来募集更多的炎症细胞扩大炎症反应[3]。

作为重要的模式识别受体——NLRP 家族蛋白成员, NLRP3 拥有保守的三联结构域结构, 包括中央核苷酸结合和寡聚化结构域(NOD)、N 端的 PYD (pyrin domain)效应结构域以及 C 端富含亮氨酸的数量可变的重复结构域(LRRs)[4]。其中, C 端的 LRRs 结构域可与两个分子伴侣(HSP90 和 SGT1)结合[5-6], 使 NLRP3 在静息状态下稳定存在并定位于内质网[7]。当感知到细菌、胞外 ATP 或 K^+外流时, LRRs 与分子伴侣分离[8-9], NLRP3 的构象发生改变并通过 NACHT 结构域的相互作用发生聚集, 引起自身寡聚化[10]。另外, N 端的

收稿日期: 2024-03-31; **修订日期:** 2024-05-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172996); 中央高校基本科研业务经费项目(2662023SCPY005).

作者简介: 陈振威(1997–), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类营养免疫学. E-mail: chenzhenwei@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 王庆超, 副教授, 研究方向为鱼类免疫代谢学. E-mail: qcwang@mail.hzau.edu.cn

PYD (pyrin domain)结构域为其效应域[11], 可与同样含有 PYD 结构域的 ASC 蛋白结合[12-13], 并通过其 CARD 结构域招募 pro-caspase1, 从而形成 NLRP3 炎症小体复合物[14-15]。此外, 鱼类 NLRP3 还包含特有的 C 末端 B30.2 (PRY/SPRY)结构域[16-17], 尽管其功能尚不清楚。已有研究表明, NLRP3 炎症小体在鱼类抵抗细菌感染和重金属胁迫中发挥重要功能, 如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中敲低 NLRP3 会促进杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)定植, 反之过表达 NLRP3 则抑制细菌的定植[17]; 水体镉暴露可激活鲤(*Cyprinus carpio*)前肾和脾脏中的 NLRP3 并诱导淋巴细胞焦亡, 若抑制 NLRP3 活性可减弱淋巴细胞的焦亡水平[18]。大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是鲈形目(Perciformes)、棘臀鱼科(Centropomidae)、黑鲈属鱼类, 原产于北美加利福尼亚州[19], 因其生长迅速、肉质鲜美且无肌间刺, 自 20 世纪引入我国养殖后已经成为我国重要的名特优淡水养殖品种[20]。《中国渔业年鉴》统计显示, 2022 年我国淡水鲈全年总产量达 802486 t, 其以大口黑鲈为主要品种。然而, 随着大口黑鲈养殖密度升高, 水体恶化及病原体快速增殖等严重威胁了产业发展, 尤其是各种应激导致的炎症反应严重损害了大口黑鲈健康[21]。NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡与炎症因子的释放密切相关[16], 因此急需在大口黑鲈中开展有关 NLRP3 炎症小体的深入研究。考虑目前仍缺少针对大口黑鲈 NLRP3 的商业化抗体, 严重限制了 NLRP3 相关的蛋白功能研究的基础, 因此, 本研究利用分子克隆、原核表达重组质粒构建、质谱鉴定蛋白和免疫动物等步骤, 制备针对大口黑鲈 NLRP3 蛋白的兔源和鼠源多克隆抗体, 以期为后续开展大口黑鲈 NLRP3 炎症小体及细胞焦亡研究提供重要的材料基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

大口黑鲈来自华中农业大学水产养殖基地, 体重 30 g 左右, 鲜活健康且无明显病征, 未经任何试剂或药物预处理。

pET-32a 原核表达质粒购自武汉淼灵生物科技有限公司, 感受态细胞 DH5α 与 BL21 (DE3)购自上海昂羽生物科技公司。

高保真扩增酶与逆转录酶购自南京诺维赞生物科技股份有限公司, TRIzol 试剂购自北京金沙生物科技有限公司, 胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 限制性内切酶与 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, Ni-NTA Beads 6FF 重力柱 5 mL 购自常州天地人和生物科技有限公司。

1.2　仪器与设备

PCR 仪(eppendorf)、离心机(eppendorf)、超声破碎仪(宁波新芝)、摇床(天津欧诺)、琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一)、蛋白凝胶电泳仪(Bio-Rad)、核酸凝胶成像仪(Bio-Rad)、蛋白凝胶成像仪(Bio-Rad)、高分辨质谱仪(ThermoFisher Scientific)、高效液相色谱仪(ThermoFisher Scientific)、冷冻浓缩离心干燥器(太仓市华美生化仪器厂)、台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、台式高速冷冻离心机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3　方法

1.3.1　蛋白结构分析与抗原预测　首先登录 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), 下载大口黑鲈 NLRP3 蛋白的氨基酸序列的具体序列信息(NCBI reference sequence: XM_038710091.1)分析, 利用 BepiPred 3.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/)对大口黑鲈 NLRP3 蛋白进行免疫原性分析, 利用 Expasy (https://web.expasy.org/protscale/)对大口黑鲈 NLRP3 蛋白进行疏水性分析。

1.3.2　基因扩增及原核载体构建　大口黑鲈 *nlrp3* 的基因扩增方法基本同徐静[22]的方法, 不同之处在于选择的原核表达载体为 pET-32a, 并用 Primer 5.0 设计带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的特异性引物, 交由武汉奥科鼎盛生物有限公司合成。引物信息见表 1。

1.3.3　原核表达诱导与纯化　大口黑鲈 NLRP3 重组蛋白的诱导方法基本同徐静[22]的方法, 不同之处在于本研究 BL21 (DE3)菌体悬液破碎经 12000 r/min 离心 10 min 后发现, 诱导后表达的目

表 1 PCR 扩增引物

Tab. 1 PCR amplification primers

引物名称 primer name	正向引物 (5′−3′) forward primer (5′−3′)	反向引物 (5′−3′) reverse primer (5′−3′)
NLRP3	AAGAGCCAACTGGAGAGCGCA	CGTGATGAACAGCTCTGGGTT
酶切 NLRP3	CGCGGATCCAAGAGCCAACTGGAGAGCGCA	CCGCTCGAG CGTGATGAACAGCTCTGGGTT
Pet-32a 载体引物	ATAGCAGCAGAGCAGACA	AGGACAGACCCAGTTCAT

的蛋白主要存在于上清中, 而非包涵体形式。随后进行上清蛋白的纯化, 具体操作如下: 收集菌体蛋白上清液, 以 0.45 μm 滤膜进行初步过滤后, 注入已用 10 mmol/L 咪唑平衡后的 Ni-NTA Beads 6FF 重力柱中, 静置 10 min 以便上清中目的蛋白与镍柱充分结合。之后去除残余液体并以 50 mmol/L 咪唑进行洗杂, 并开始加入洗脱液(250 mmol/L 咪唑)以洗脱目的蛋白。随后以考马斯亮蓝 G-250 检测流出液中是否出现蛋白, 待溶液变蓝后便开始收集流出液, 直至流出液与考马斯亮蓝 G-250 混合后不再变蓝为止。上述收集到的液体即为纯化的 MsNLRP3 重组蛋白。

1.3.4 重组蛋白的鉴定 取上述获得的纯化 MsNLRP3 重组蛋白, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测重组蛋白的分子量大小是否与预期一致。同时采用质谱分析目的蛋白的氨基酸序列, 以确定该重组蛋白为目的蛋白, 具体方法如下: 将 SDS-PAGE 获得的目的蛋白条带经过脱色、脱水、冻干、还原、吸胀等步骤后以 0.02 μg/μL 胰蛋白酶进行酶解处理, 随后使用肽段萃取液获得肽段, 随后通过 C18 柱以甲酸和乙腈溶液完成肽段脱盐; 将肽段以 Nano-HPLC 液相系统 UltiMate 3000 RSLCnano (ThermoFisher Scientific) 进行分离, 结合 Q-Exactive plus 质谱仪(ThermoFisher Scientific) 进行质谱分析, 通过质荷比结果比对等分析实验数据。

1.3.5 多克隆抗体的制备及间接 ELISA 法测定抗血清效价 大口黑鲈 NLRP3 多克隆抗体的制备参考陈曦[23]的方法, 分别选择 1 只日本大耳兔和 3 只 Balb/C 小鼠作为免疫动物, 首次免疫时分别以 400 μg 和 100 μg 的纯化重组蛋白与弗氏完全佐剂(1∶1)混匀后对每只免疫动物进行皮下注射; 随后每隔 2 周分别以 150 μg 和 50 μg 的纯化重组蛋白与弗氏不完全佐剂(1∶1)混匀后进行加强免疫 3 次, 获得抗血清后通过 Sepharose 4B 亲和纯化柱完成抗血清的纯化。在抗血清的效价检测时, 首先将 MsNLRP3 蛋白使用碳酸盐包被液包被酶标板中, 随后以梯度稀释的兔源和鼠源抗血清为一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔(或鼠) IgG 为二抗, 经四甲基苯胺(TMB)溶液显色后用酶标仪测定 $OD_{450\ nm}$ 值, 并以兔(或鼠)免疫前的血清为阴性对照, 每个样本重复 3 次, 结果取平均值。以检测孔与阴性对照孔 $OD_{450\ nm}$ 的比值≥2.1 时的最大稀释度判定为该抗血清的效价。

1.3.6 多克隆抗体的特异性检测 将纯化后的重组 MsNLRP3 蛋白和健康大口黑鲈组织分别以 RIPA 中性裂解液进行裂解获得蛋白上清液后, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 以 95 ℃金属浴加热 5 min 并离心后取上清作为待测样品。随后将上述样品进行 SDS-PAGE 电泳, (90 V, 2 h)。将 SDS-PAGE 分离后的凝胶以半干转的方法将蛋白转至 PVDF 膜上, 随后使用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, 清洗后加入兔源(或鼠源)的多克隆抗体稀释液(稀释比例 1∶1000)在 4 ℃过夜孵育, PBST 清洗后使用 HRP 标记的山羊抗兔(或鼠) IgG 的二抗稀释液(稀释比例 1∶10000)室温孵育 2 h, PBST 清洗后以 ECL 显色。

1.3.7 多克隆抗体的初步应用 参考课题组前期已有的方法[24], 使用柱状黄杆菌对大口黑鲈进行浸泡感染实验, 分别在感染前后采集大口黑鲈的鳃组织, 分别使用多聚甲醛固定或者冻存−80 ℃冰箱中。将固定的鳃组织制作石蜡切片后使用 HE 染色观察鳃组织结构在感染前后的变化情况; 而将感染前后分别冻存的鳃组织使用 RIPA 裂解后进行蛋白质印迹分析。

2　结果与分析

2.1　目的基因克隆

通过序列分析显示, 大口黑鲈 NLRP3 蛋白具有 PYRIN、FISNA、NACHT、LRR 重复序列、PRY、SPRY 等结构域(图 1a)。其中, PYRIN 结构域主要功能是作为接头分子结合 ASC 等蛋白从而起组装作用; FISNA 高度结合 NACHT 结构域, NACHT 结构域可能参与凋亡以及 MHC 转录激活的蛋白; LRRs 区域为富含亮氨酸的重复序列; PRY 及 SPRY 功能广泛, 包括细胞因子信号转导、RNA 代谢、逆转录病毒免疫等多种功能。基于蛋白的二级结构、疏水性和免疫原性分析, 发现 NLRP3 第 20~200 氨基酸位置以及第 800~1000 氨基酸位置区域在 0 轴以下, 表明该区域整体亲水性较高(图 1b); 同时发现第 40~190 氨基酸区域整体免疫原性较高(图 1c)。因此本研究认为大口黑鲈 NLRP3 蛋白的 PYRIN 结构域第 40~190 氨基酸区域具有较高的免疫原性和亲水性, 可以引起比较好的免疫应答反应, 作为本研究开展原核表达的目的区段。

根据目的区段添加酶切位点设计上下游引物(F: 5′-CGCGGATCCAAGAGCCAACTGGAGAGCGCA-3′, R: 5α′-CCGCTCGAGCGTGATGAACAGCTCTG GGTT-3′), 以大口黑鲈肝脏 cDNA 为模板通过 PCR 扩增带 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点的大口黑鲈 NLRP3 目的基因片段, 1.0%琼脂糖凝胶电泳显示获得的条带大小与预计相符, 片段大小为 453 bp (图 1d)。

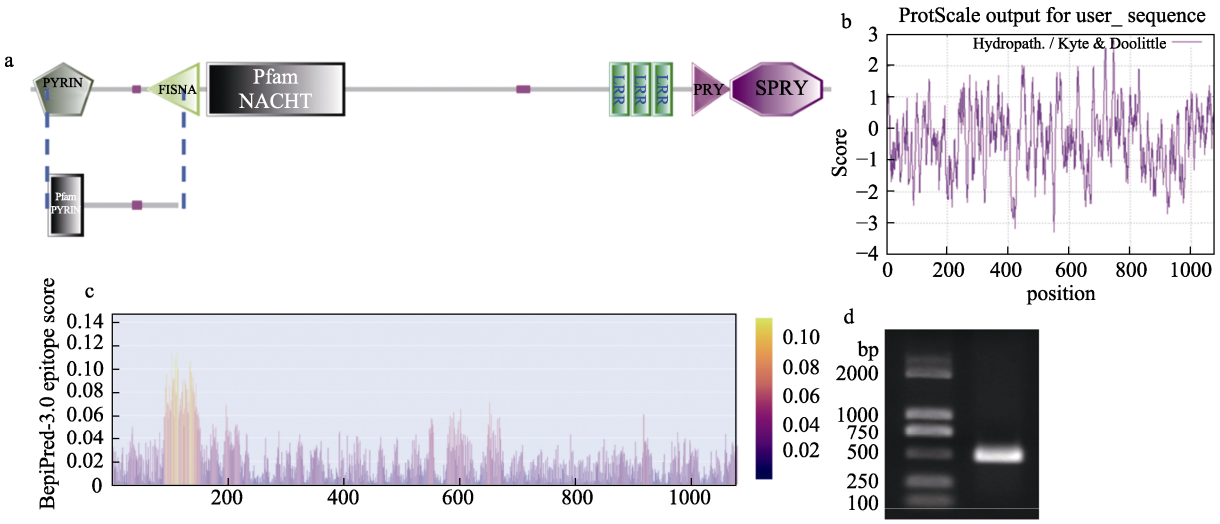

图 1　大口黑鲈 NLRP3 的蛋白结构(a)、疏水性(b)及免疫原性(c)分析以及 NLRP3 基因 PCR 扩增结果(d)

Fig. 1　Analysis of largemouth bass NLRP3 protein structure (a), hydrophobicity (b) and immunogenicity (c), and PCR amplification results of NLRP3 gene (d)

2.2　原核重组质粒的构建与鉴定

将纯化、酶切、连接后的产物转化到 DH5α 后获得的抗氨苄阳性单菌落, 分别使用针对 NLRP3 目的区段的特异性引物和针对 pET-32a 质粒多克隆位点区的载体引物进行 PCR 扩增, 1.0%琼脂糖凝胶电泳后检测到大小分别为 453 bp 和 1166 bp 的扩增条带, 与预期相符(图 2a)。将阳性鉴定的 DH5α 单菌落送去测序公司进行测序后比对结果, 发现重组质粒序列与 NCBI 上的 NLRP3 序列完全相同(图 2b), 说明 pET-32a-NLRP3 原核重组质粒构建成功。

2.3　重组蛋白 MsNLRP3 的表达、纯化及鉴定

将上述 pET-32a-MsNLRP3 原核重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞, 扩大培养后, 加入不同浓度的 IPTG 于 16 ℃过夜诱导表达原核重组蛋白。由 SDS-PAGE 结果可知, 在加入 IPTG 诱导后在 37 kDa 位置可见重组蛋白 MsNLRP3 的特异性条带; 对比不同的 IPTG 浓度可知, 0.8 mmol/L IPTG 的诱导效果最佳, 因此在本研究中将重组蛋白的 IPTG 诱导浓度确定为 0.8 mmol/L。将含有 MsNLRP3 重组蛋白的 BL21 (DE3)感受态细胞进行高压破碎后分别收集上清

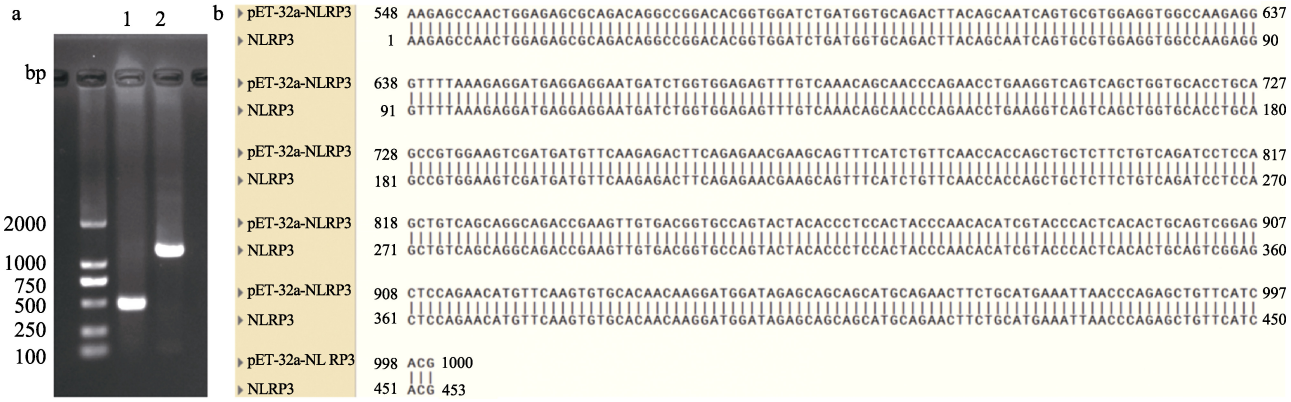

图 2 NLRP3 基因原核重组质粒的 PCR 检测(a)及测序后比对结果(b)分析

Fig. 2 PCR amplication (a) and sequence alignment (b) of constructed NLRP3 prokaryotic recombinant plasmid

和包涵体, 经 SDS-PAGE 结果显示在上清和包涵体中均可检测到 MsNLRP3 重组蛋白。随后将包涵体和上清分别进行纯化, 发现经过镍柱纯化获得的 pET-32a-NLRP3 重组蛋白上清液条带十分单一, 蛋白分子量大小约 38 kDa, 与预计大小相符(图 3)。

将 SDS-PAGE 目的条带胶块开展质谱检测分析。质谱分析过程将重组蛋白 pET-32a-MsNLRP3 打成肽段, 通过质谱分析获得重组蛋白部分肽段的质荷比(图 4)。质谱分析显示共有 33 个肽段与理论的氨基酸序列相符合, 匹配度达到 100%, 并且这些肽段共覆盖理论序列的 81%, 结果证明大口黑鲈 pET-32a-NLRP3 重组蛋白原核表达成功并完成纯化, 因此本研究选用重组蛋白纯化后的上清液进行免疫动物。

2.4 NLRP3 多克隆抗体效价检测

收集经过 4 次免疫的兔源和鼠源 MsNLRP3 抗血清, 以间接 ELISA 方法检测抗体的效价, 取 3 次重复实验结果的平均值, 阳性血清 $OD_{450\,nm}$ 与阴性血清 $OD_{450\,nm}$ 的比值大于 2∶1 的血清稀释度为抗体的效价, 阴性血清作为空白对照, 其值均小于 0.1, 结果显示兔源和 3 只鼠源 NLRP3 抗血清的效价分别为 1∶10240 K、1∶1024 K、1∶1024 K、1∶1024 K (图 5)。

2.5 NLRP3 多克隆抗体的特异性检测

分别取原核重组 MsNLRP3 蛋白和健康大口黑鲈组织均以 RIPA 中性裂解液进行裂解, 获得蛋白上清液进行免疫印迹分析。图 6a 结果显示, 转染 pET-32a-NLRP3 的工程菌在泳道 2 和 3 中检测到分子量约 37 kDa 的条带, 为重组 pET-32a-NLRP3 条带大小; 在 IPTG 诱导前的泳道 2 中检测到阳性条带, 为 pET-32a-NLRP3 阳性工程菌在基底水平表达的重组蛋白, 表达量较低, 而在 IPTG 诱导后泳道 3 中的重组 MsNLRP3 蛋白表达

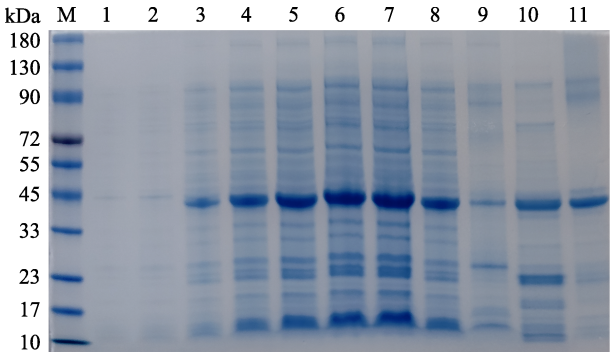

图 3 SDS-PAGE 检测 NLRP3 重组蛋白的表达和纯化电泳图

M. 蛋白 marker; 1. 含空质粒的 BL21 (DE3)菌体; 2. 转化 pET-32a-NLRP3 重组质粒的 BL21 (DE3)工程菌(未诱导); 3. 以 0.2 mmol/L IPTG 诱导的工程菌; 4. 以 0.4 mmol/L IPTG 诱导的工程菌; 5. 以 0.6 mmol/L IPTG 诱导的工程菌; 6. 以 0.8 mmol/L IPTG 诱导的工程菌; 7. 以 1.0 mmol/L IPTG 诱导的工程菌; 8. 破碎后的工程菌包涵体; 9. 破碎后的工程菌上清; 10. 纯化后的工程菌包涵体; 11. 纯化后的工程菌上清.

Fig. 3 Expression and purification of NLRP3 recombinant protein by SDS-PAGE

M. Protein marker, 1. BL21 (DE3) empty bacteria, 2. The BL21 (DE3) positive cells that convert pET-32a-NLRP3, 3. Engineering bacteria induced by 0.2 mmol/L IPTG, 4. Engineering bacteria induced by 0.4 mmol/L IPTG, 5. Engineering bacteria induced by 0.6 mmol/L IPTG, 6. Engineering bacteria induced by 0.8 mmol/L IPTG, 7. Engineering bacteria induced by 1.0 mmol/L IPTG, 8. Inclusion body of broken bacterial cells, 9. Supernatant of broken bacterial cells, 10. Purified inclusion body of broken bacterial cells, 11. Purified supernatant of broken bacterial cells.

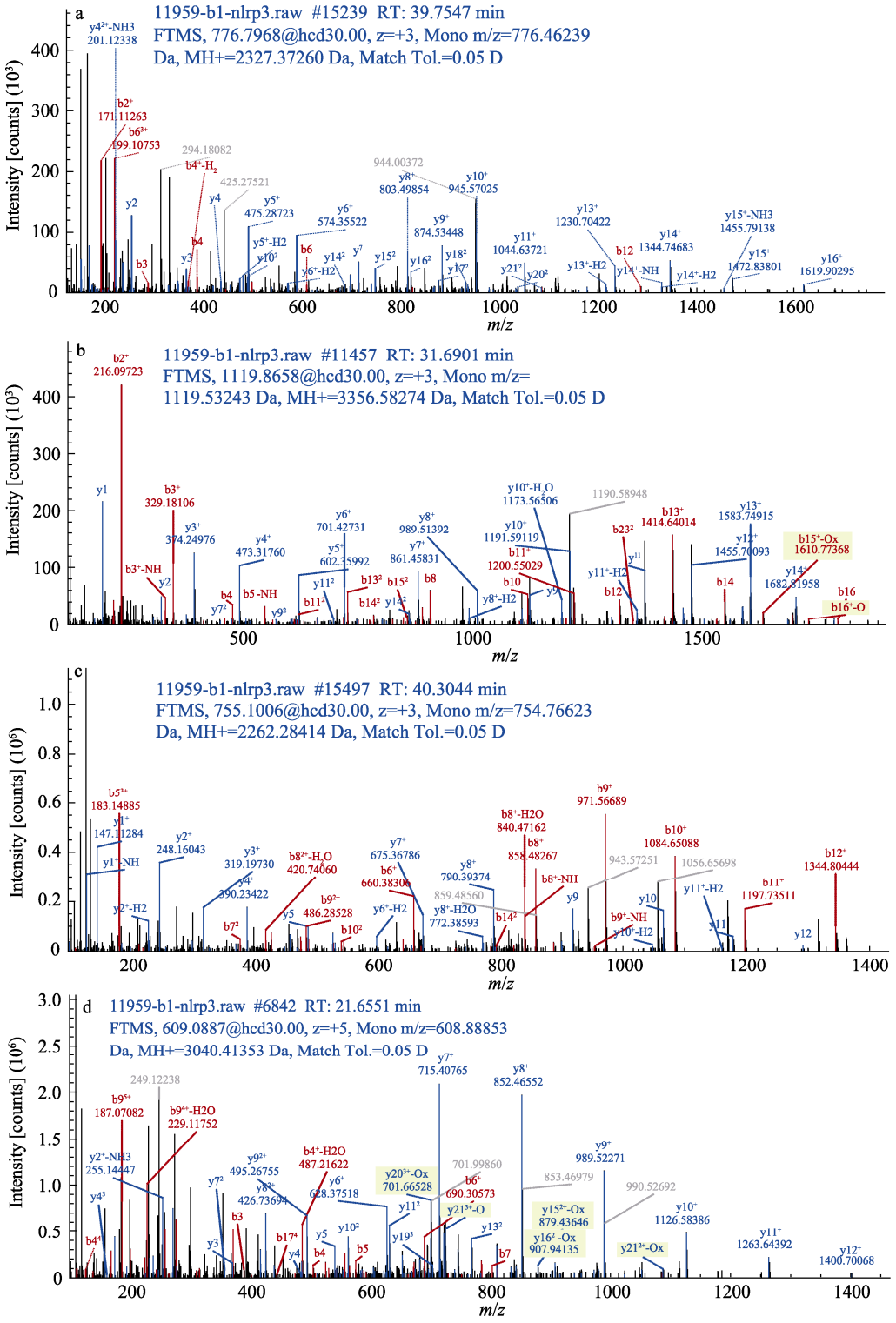

图 4　质谱分析重组蛋白 pET-32a-NLRP3 的部分代表性肽段质荷比

a. 重组蛋白肽段(RGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKG); b. 重组蛋白肽段(KSQLESADRPDTVDLMVQTYSNOCVEVAKRV); c. 重组蛋白肽段(KYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKV); d. 重组蛋白肽段(KEFLDANLAGSGSGHMHHHHHHSSGLVPRG).

Fig. 4　Mass-to-charge ratio of some peptides of recombinant protein pET-32a-NLRP3 analyzed by mass spectrometry

a. Recombinant protein peptide (RGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKG); b. Recombinant protein peptide (KSQLESADRPDTVDLMVQTYSNOCVEVAKRV); c. Recombinant protein peptide (KYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKV); d. Recombinant protein peptide (KEFLDANLAGSGSGHMHHHHHHSSGLVPRG).

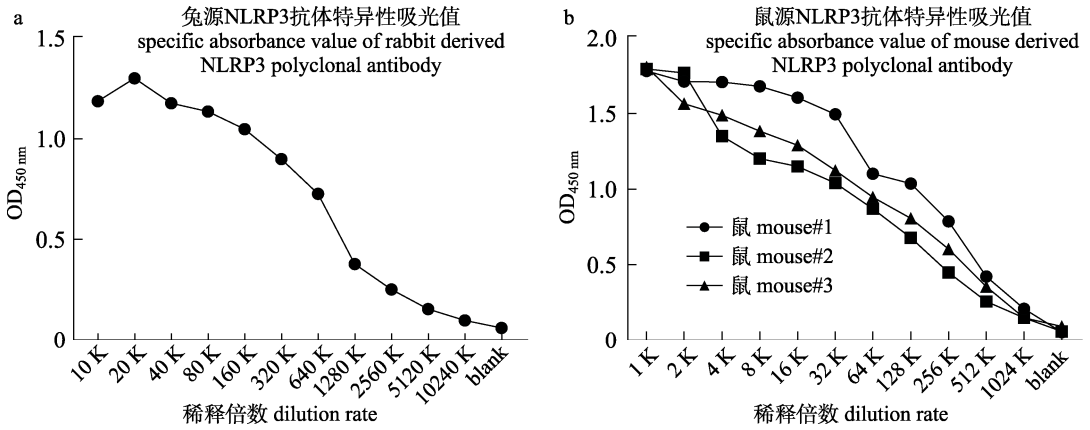

图 5 兔源(a)和鼠源(b) NLRP3 多克隆抗体效价曲线

Fig. 5 Titer curve of rabbit (a) and mouse (b) originated NLRP3 polyclonal antibody

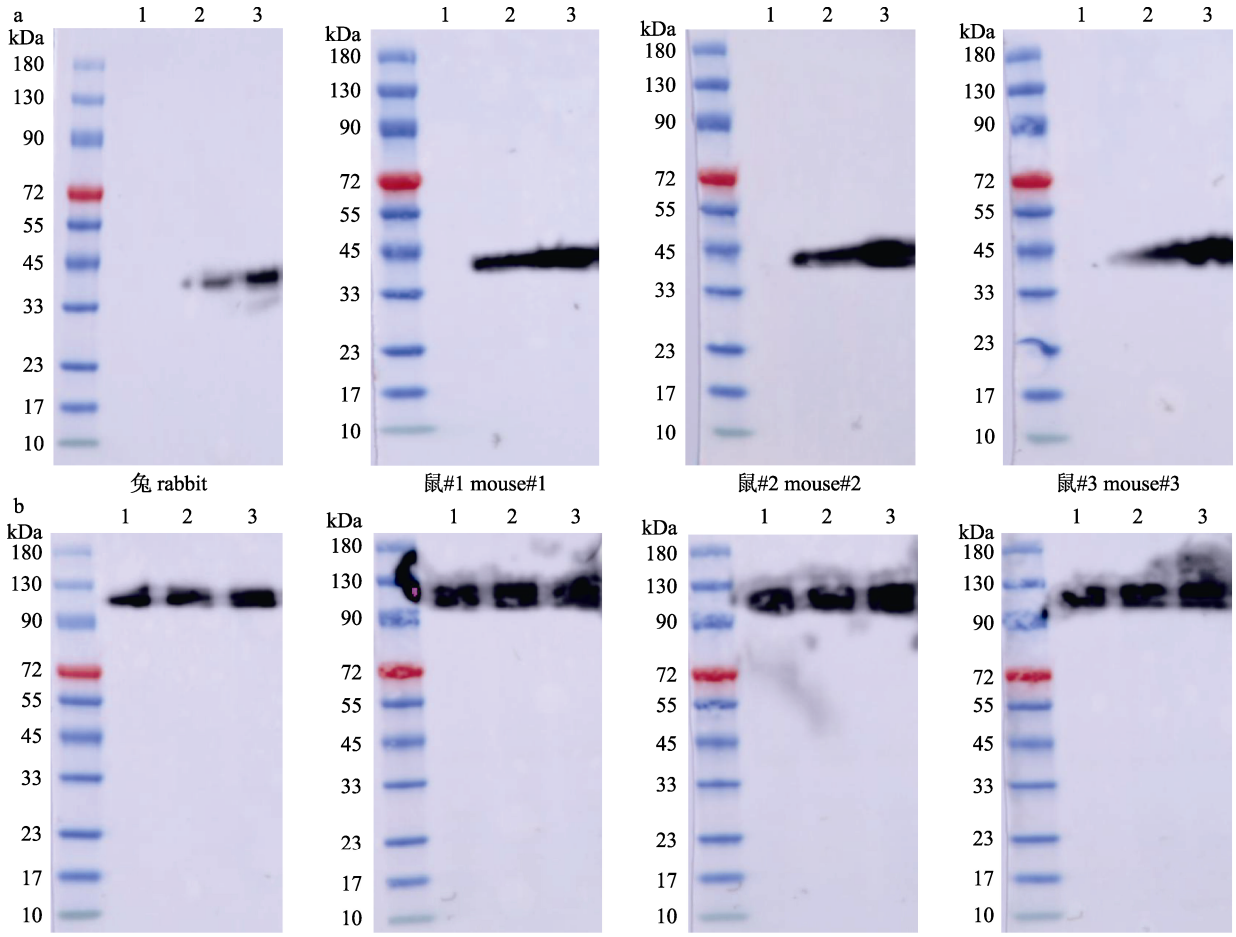

图 6 兔源和鼠源 MsNLRP3 多克隆抗体的免疫印迹分析

a. 分别使用兔源和 3 只鼠源的 NLRP3 多克隆抗体检测原核重组 MsNLRP3 蛋白. 1: 空质粒的 B21 (DE3)菌体蛋白; 2: 转染 pET-32a-NLRP3 的工程菌蛋白(未诱导); 3: 以 0.8 mmol/L IPTG 诱导的工程菌蛋白. b. 分别使用兔源和 3 只鼠源的 NLRP3 多克隆抗体检测大口黑鲈组织内源性蛋白. 1、2、3 泳道为平行组.

Fig. 6 Western blotting analysis of MsNLRP3 polyclonal antibodies from rabbit and mouse sources

a. Detection of recombinated MsNLRP3 protein by rabbit and mouse derived NLRP3 polyclonal antibody. 1: pure bacterial protein of B21 (DE3) with empty plasmid; 2: engineering BL21 (DE3) bacteria protein transfected with pET-32a-NLRP3 without induction; 3: engineering BL21 (DE3) bacteria protein with 0.8 mmol/L IPTG induction. b. Detection of NLRP3 in largemouth bass tissue protein by rabbit and mouse derived NLRP3 polyclonal antibody with three replicates. Lane 1, 2, 3 are parallel.

水平大量增加, 显著高于泳道 2 中诱导前的蛋白表达量。图 6b 结果显示, 健康大口黑鲈组织蛋白的泳道检测到分子量约 121 kDa, 为内源性 NLRP3 条带大小, 蛋白条带清晰且单一, 说明制备的兔源和鼠源 MsNLRP3 多克隆抗体可用于大口黑鲈的 NLRP3 原核重组蛋白和内源性蛋白。

2.6　应用制备的兔源 NLRP3 多克隆抗体检测柱状黄杆菌感染后的大口黑鲈鳃 NLRP3 表达

采集柱状黄杆菌感染前后大口黑鲈的鳃组织, 用于石蜡切片制备和蛋白印迹检测。将获得的石蜡切片进行 HE 染色, 结果发现柱状黄杆菌感染后大口黑鲈的初级鳃丝加厚, 次级鳃丝明显变短, 鳃上皮细胞脱落增加(图 7a)。随后, 以本研究制备的 MsNLRP3 多克隆抗体进行蛋白印迹检测, 结果发现柱状黄杆菌感染后诱导了大口黑鲈鳃组织中 NLRP3 蛋白的表达(图 7b), 说明本研究制备的大口黑鲈 NLRP3 多克隆抗体具有很好的应用效果。

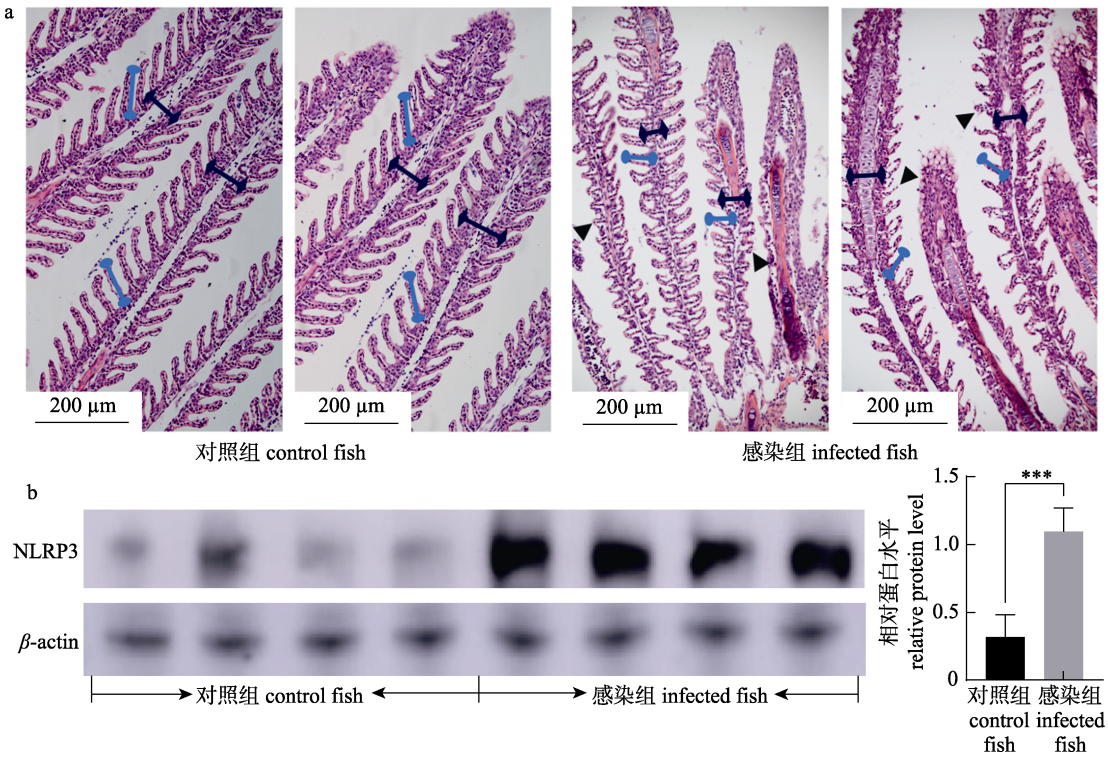

图 7　柱状黄杆菌感染大口黑鲈前后鳃组织病理切片(a)及 NLRP3 表达(b)的免疫印迹分析

↔示初级鳃丝宽度; ⟷示次级鳃丝长度; ▼示脱落上皮细胞; ***表示差异显著(P<0.001).

Fig. 7　The pathological changes (a) and western blotting analysis of NLRP3 protein levels (b) in largemouth bass gill before and after *Flavobacterium columnare* infection

↔ indicates the primary lamina width, ⟷ indicates the secondary lamina length, ▼indicates the exfoliated epithelial cell. *** denotes significant differenent (P<0.001).

3　讨论

NLRP3 在哺乳动物中可激活 NLRP3 炎症小体诱导细胞焦亡[25]。笔者前期在大口黑鲈上的研究表明, 细菌感染可诱导鳃和肝脏等组织中 NLRP3 炎症小体和细胞焦亡相关基因的表达[26], 因此本研究尝试制备针对 MsNLRP3 的兔源和鼠源多克隆抗体, 在蛋白层面检测 NLRP3 的表达, 并进行了初步应用。

3.1　MsNLRP3 的原核表达和多克隆抗体制备

本研究首次在原核系统中表达了大口黑鲈 *nlrp3* 基因, 并通过一系列实验制备了兔源和鼠源的 MsNLRP3 多克隆抗体。首先在原核表达部分, 蛋白全长序列因包含了其所有的抗原表位可引起更优的免疫效果[23], 然而分子量越大的蛋白在原核表达系统中表达难度越高, 因此通常选择亲水

性较高、免疫原性较强的区段用于原核表达, 如王俊丽等[27]选择淇河鲫(*Carassius auratus* var. *Qihe*) IL-8 基因编码序列中不含信号肽的区段用于原核表达, 获得 27.8 kDa 的重组蛋白; 郑树城等[28]选择鲤疱疹病毒 3 型 ORF136 基因的 31~157 位氨基酸序列用于原核表达。本研究选择 NLRP3 的 N 端 PYRIN 结构域中具有高免疫原性、高亲水性、整体大小为 453 bp 的基因区段作为目的克隆区段, 此区段表达的蛋白大小预计约为 16.65 kDa。另外, 在原核表达载体的选择方面, 由于 pET-32a 内含 T7 启动子, 可快速激活 T7 RNA 聚合酶, 其催化合成 mRNA 的速度比一般大肠杆菌 RNA 聚合酶快 5 倍左右, 是常用的原核表达载体之一[29], 因此本研究选择 pET-32a 作为原核表达载体。为实现原核重组质粒的表达, 本研究选择可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶的 BL21 (DE3)作为表达菌株[30], 大大提高重组蛋白的表达效率。

在成功构建原核表达载体后, 本研究使用 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 等 5 个不同 IPTG 浓度诱导目的蛋白的表达, 发现 0.8 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导蛋白表达效果最佳。为防止高温下菌体快速新陈代谢导致表达蛋白的进程, 使得蛋白来不及正确折叠而成为包涵体形式[31], 确定最终的诱导条件为 16 ℃、0.8 mmol/L 终浓度 IPTG、过夜诱导, 可获得更多的蛋白表达于上清中。随后将上清中的重组蛋白使用进行亲和层析纯化, 由于重组蛋白含有 6×His 标签, 此标签会与镍柱中 Ni^{+}配位形成稳定的络合物, 从而将带有 6×His 标签的重组蛋白特异性地结合在 Ni 柱上[32], 其他的杂蛋白则会流穿, 而咪唑会与 6×His 标签竞争性结合镍柱, 因此最后使用高浓度的咪唑洗脱目的蛋白。为鉴定该原核系统表达的蛋白为目标蛋白, 传统上采用 SDS-PAGE 电泳后根据分子量大小判断是否为目的蛋白[33]。本研究中将纯化后的上清蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 并切下目的条带区域开展质谱分析, 结果显示经镍柱纯化的上清蛋白液条带十分单一, 蛋白分子量大小约 38 kDa, 与预计大小相符。另外, 将 SDS-PAGE 目的条带胶块开展质谱检测分析, 发现重组蛋白 ET-32a-MsNLRP3 打碎后有 33 个肽段与理论的氨基酸序列相符合, 匹配度达到 100%, 并且这些肽段共覆盖理论序列的 81%, 这远高于前期罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) Doublesex 原核表达后蛋白质谱结果中报道的 61.36%的理论序列覆盖度[34]。以上结果证明, 大口黑鲈 pET-32a-NLRP3 重组蛋白原核表达成功并完成纯化, 因此本研究选用重组蛋白纯化后的上清液进行免疫动物获得针对大口黑鲈 NLRP3 蛋白的多克隆抗体。

3.2 MsNLRP3 多克隆抗体的检测结果和初步应用分析

本研究将兔源和鼠源大口黑鲈 NLRP3 蛋白的多克隆抗体首先通过 ELISA 检测效价, 结果分别是 1∶10240 K (兔)和 1∶1024 K (鼠); 这显著高于前期报道的针对鲤(*Cyprinus carpio*) irisin B 蛋白的鼠源多克隆抗体效价 1∶270000[35]和针对大口黑鲈弹状病毒 G 蛋白的鼠源多克隆抗体效价 1∶204800[36], 表明本研究获得的兔源和鼠源 NLRP3 多克隆抗体效价符合要求。随后, 通过蛋白免疫印迹检测多克隆抗体特异性识别 BL21 (DE3)重组蛋白和大口黑鲈组织内源性 NLRP3 蛋白的效果: BL21 (DE3)原核表达重组蛋白的大小为 37 kDa, 包括表达的 NLRP3 目的区段的 16.65 kDa 以及 pET-32a 载体所有标签蛋白的 20 kDa; 而大口黑鲈组织内源性的 NLRP3 蛋白为 121 kDa 的完整的 NLRP3 蛋白。本研究中获得的 1 只兔源和 3 只鼠源多克隆抗体均能识别上述 37 kDa 和 121 kDa 的重组蛋白和内源性 NLRP3 蛋白, 且条带单一, 表明本研究成功制备了兔源和鼠源的大口黑鲈 NLRP3 多克隆抗体。

为进行上述多克隆抗体的初步应用, 本研究参考前期方法使用柱状黄杆菌浸泡感染大口黑鲈[24,37], 通过组织病理学切片观察发现, 大口黑鲈的鳃组织出现明显病理变化, 表现为初级鳃丝加厚、次级鳃丝变短、鳃上皮细胞脱落增加等, 表明成功构建了柱状黄杆菌浸泡感染大口黑鲈的模型, 这与前期以柱状黄杆菌感染黄颡鱼[24]、草鱼[37]等取得的结果一致。随后使用上述获得的兔源 MsNLRP3 多克隆抗体检测感染前后鳃组织中 NLRP3 的蛋白表达情况, 结果发现, 柱状黄杆菌

感染后诱导了NLRP3蛋白的表达, 这与前期细菌感染后斑马鱼[16]和牙鲆[17]中 NLRP3 蛋白表达增加的结果一致, 也证明本研究制备的大口黑鲈NLRP3 多克隆抗体具有很好的应用前景, 可准确检测病原感染后 NLRP3 蛋白表达的上调。

4　结论

本研究首次通过原核表达系统获得大口黑鲈NLRP3 原核重组的上清蛋白, 经过 SDS-PAGE 和质谱验证后免疫兔和鼠获得针对大口黑鲈NLRP3 的多克隆抗体, 表现出优秀的效价和特异性, 同时该NLRP3多克隆抗体可以特异性识别病原感染后大口黑鲈组织中 NLRP3 蛋白的上调表达, 这为后续深入开展大口黑鲈细胞焦亡和炎症反应研究等奠定了重要的材料基础。

参考文献:

[1] Wang Z, Gu Z Y, Hou Q, et al. Zebrafish GSDMEb cleavage-gated pyroptosis drives septic acute kidney injury *in vivo*[J]. Journal of Immunology, 2020, 204(7): 1929-1942.

[2] de Carvalho Ribeiro M, Szabo G. Role of the inflammasome in liver disease[J]. Annual Review of Pathology, 2022, 17: 345-365.

[3] Stancu I C, Cremers N, Vanrusselt H, et al. Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo[J]. Acta Neuropathologica, 2019, 137(4): 599-617.

[4] Platnich J M, Muruve D A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, 670: 4-14.

[5] Marunouchi T, Iguchi A, Shindo A, et al. Involvement of Hsp90 in NLRP3 inflammasome activation in the failing heart following myocardial infarction in rats[J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 212: 115547.

[6] Christgen S, Kanneganti T D. Inflammasomes and the fine line between defense and disease[J]. Current Opinion in Immunology, 2020, 62: 39-44.

[7] Shi W, Xu G, Zhan X Y, et al. Carnosol inhibits inflammasome activation by directly targeting HSP90 to treat inflammasome-mediated diseases[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11: article No.252.

[8] Srivastava R K, Muzaffar S, Khan J, et al. HSP90, a common therapeutic target for suppressing skin injury caused by exposure to chemically diverse classes of blistering agents[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2024, 388(2): 546-559.

[9] Li F, Song X W, Su G F, et al. AT-533, a Hsp90 inhibitor, attenuates HSV-1-induced inflammation[J]. Biochemical Pharmacology, 2019, 166: 82-92.

[10] Xia C Y, Guo Y X, Lian W W, et al. The NLRP3 inflammasome in depression: Potential mechanisms and therapies[J]. Pharmacological Research, 2023, 187: 106625.

[11] Zhen Y, Zhang H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 00276.

[12] Fu J N, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Annual Review of Immunology, 2023, 41: 301-316.

[13] Stutz A, Horvath G L, Monks B G, et al. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation[J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1040: 91-101.

[14] Sun L B, Ma W, Gao W L, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10: article No.542.

[15] Sharma B R, Kanneganti T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases[J]. Nature Immunology, 2021, 22: 550-559.

[16] Li J Y, Wang Y Y, Shao T, et al. The zebrafish NLRP3 inflammasome has functional roles in ASC-dependent interleukin-1β maturation and gasdermin E-mediated pyroptosis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(4): 1120-1141.

[17] Chen H, Ding S F, Tan J C, et al. Characterization of the Japanese flounder NLRP3 inflammasome in restricting *Edwardsiella piscicida* colonization *in vivo*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2020, 103: 169-180.

[18] Zhang Y M, Liu Q Q, Yin H, et al. Cadmium exposure induces pyroptosis of lymphocytes in carp pronephros and spleens by activating NLRP3[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 202: 110903.

[19] Wang Z W. Study on the mechanism of inflammation induced by *Micropterus salmoides* rhabdovirus and its antiviral drugs[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. [王志雯. 大口黑鲈弹状病毒诱发炎症的机制及抗病毒药物研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.]

[20] Wang Y. Application of phytosterols and tannic acid in the diet of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2023. [王艺. 植物甾醇和单宁酸在大口黑鲈饲料中的应用研究[D]. 荆州: 长江大学, 2023.]

[21] Wang K W. Effect of protein and starch levels in diet on

growth, feed utilization and liver health of largemouth bass *Micropterus salmoides*[D]. Chongqing: Southwest University, 2023. [王康伟. 饲料蛋白和淀粉水平对大口黑鲈生长、饲料利用和肝脏健康的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2023.]

[22] Xu J. Development and preliminary application of monoclonal antibodies against chicken MIF protein and polyclonal antibodies against CD74 protein[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023. [徐静. 鸡 MIF 蛋白单克隆抗体和 CD74 蛋白多克隆抗体的研制及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.]

[23] Chen X. Identification, expression,and characterization analysis of the immunogenic protein ORF36 of *Anguillid herpesvirus*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2023. [陈曦. 鳗鲡疱疹病毒免疫原性蛋白 ORF36 的鉴定、表达及特征分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2023.]

[24] Wang Q, Shen J Y, Yan Z T, et al. Dietary *Glycyrrhiza uralensis* extracts supplementation elevated growth performance, immune responses and disease resistance against *Flavobacterium columnare* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2020, 97: 153-164.

[25] Chang M X. Emerging mechanisms and functions of inflammasome complexes in teleost fish[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1065181.

[26] Wang M Y, Chen Z W, Wang Y H, et al. Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exhibited better growth potential after adaptation to dietary cottonseed protein concentrate inclusion but experienced higher inflammatory risk during bacterial infection[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 997985.

[27] Wang J L, Chen J D, Lu R H, et al. Construction of prokaryotic expression system for IL-8 of *Carassius auratus* var. *Qihe* and preparation of polyclonal antibody[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 970-976. [王俊丽, 陈金顶, 卢荣华, 等. 淇河鲫 IL-8 原核表达系统的构建及多克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 970-976.]

[28] Zheng S C, Li Y Y, Wang Q, et al. Identification and development of a polyclonal antibody against proteins encoded by the *ORF136* gene in *Cyprinid herpesvirus* 3[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 204-210. [郑树城, 李莹莹, 王庆, 等. 鲤疱疹病毒 3 型 ORF136 基因编码蛋白多克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 204-210.]

[29] Ye J. Construction of a T7 expression system in *Bacillus subtilis*[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2022. [叶静. 枯草芽孢杆菌 T7 表达系统构建[D]. 天津: 天津商业大学, 2022.]

[30] Xie T B. Research progress on the expression system of *Escherichia coli*[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2008, 5(3): 77-82. [解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2008, 5(3): 77-82.]

[31] Dong X, Xin Y. Strategies for soluble expression of recombinant protein in *Escherichia coli*[J]. Journal of Dalian Medical University, 2007, 29(4): 393-395. [董旭, 辛毅. 重组蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的策略[J]. 大连医科大学学报, 2007, 29(4): 393-395.]

[32] Chang H Z, Chang J, Zhan J P, et al. Comparison of various methods for purification of recombinant inclusion body protein[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(7): 862-867. [常恒祯, 常江, 战俊澎, 等. 包涵体重组蛋白不同纯化方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(7): 862-867.]

[33] Yan X, Yang L P, Zheng W J, et al. Preparation of the antibody and tissue distribution of the peptide transporter PepT1 in *Cyprinus carpio* L.[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 513-521. [闫潇, 杨丽萍, 郑文佳, 等. 鲤肠道小肽转运载体 PepT1 多克隆抗体的制备及其组织表达分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 513-521.]

[34] Wang R R, Ma K Y. Prokaryotic expression of *Doublesex* gene from *Macrobrachium rosenbergii* and protein purification[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2023, 50(7): 156-163. [王瑞睿,马克异. 罗氏沼虾 *Doublesex* 基因的原核表达与蛋白纯化[J]. 广东农业科学, 2023, 50(7): 156-163.]

[35] Zhi S Y, Yang L P, Qin C B, et al. Preparation and application of polyclonal antibody of irisin of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(12): 3-18. [职韶阳, 杨丽萍, 秦超彬, 等. 鲤 irisin 多克隆抗体的制备及应用[J]. 水产学报, 2023, 47(12): 3-18]

[36] Liu H X, Zhang P P, Deng S, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of extracellular region of G protein of *Micropterus salmoides* rhabdovirus[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2023, 50(9): 3762-3770. [刘海翔, 张佩佩, 邓思, 等.大口黑鲈弹状病毒 G 蛋白胞外区原核表达及多克隆抗体制备[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(9): 3762-3770.]

[37] Guo Q, Zheng H O, Liu X, et al. Nutrient sensing signaling functions as the sensor and regulator of immunometabolic changes in grass carp during *Flavobacterium columnare* infection[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 93: 278-287.

Preparation and application of polyclonal antibody against largemouth bass NLRP3 protein

CHEN Zhenwei, JIANG Ou, TANG Weijun, JIANG Mingxu, WANG Huaichi, JIAN Yuqing, WANG Huan, ZHENG Feifei, WANG Qingchao

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: NLRP3, a classic pattern recognition receptor, combines with ASC and pro-caspase 1 to form the NLRP3 inflammasome, which is responsible for the activation of pyroptosis in teleost fish. To further investigate the role of NLRP3 protein in largemouth bass (*Micropterus salmoides*), this study amplified an *Msnlrp3* segment using largemouth bass cDNA as the template and constructed the pET-32a-MsNLRP3 prokaryotic recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transformed into BL21 (DE3) cells, and a soluble fusion protein was expressed after induction with 0.8 mmol/L isopropyl *β*-D-1-thiogalactopyranoside overnight at 16 ℃. The obtained recombinant protein was purified using affinity chromatography, and then identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometry analysis to confirm the successful construction of the prokaryotic expression system for MsNLRP3. Subsequently, the purified MsNLRP3 protein was used to immunize Japanese long-eared rabbits and Balb/C mice to obtain polyclonal antibodies, respectively. The titers and specificity of the obtained antibodies were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting. Results showed that the obtained antisera, after immunization, could specifically recognize the recombinant and endogenous NLRP3 protein in largemouth bass tissues, as indicated by a single, clear target band consistent with the expected molecular weight. Meanwhile, the titers of rabbit and mouse antisera were 1∶10240 and 1∶1024, respectively. To test the application potential, a *Flavobacterium columnare* infection model via immersion was constructed in largemouth bass, in which the gills exhibited significant histopathological changes. Western blotting analysis with the polyclonal antibody obtained from this study indicated that NLRP3 protein levels were significantly increased in gills after bacterial infection. Therefore, the polyclonal antibody against MsNLRP3 prepared in this study provides an important material basis for the functional research of NLRP3 protein in largemouth bass.

Key words: *Micropterus salmoides*; NLRP3; prokaryotic expression; recombinant protein; mass spectrometry analysis; polyclonal antibodies

Corresponding author: WANG Qingchao. Email: qcwang@mail.hzau.edu.cn