

牙鲈多聚免疫球蛋白受体基因的克隆、表达及鉴定*

许国晶 绳秀珍 战文斌

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003)

提要 采用 PCR 扩增、构建重组高效表达载体的方法,进行了牙鲈多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆、原核表达研究,并利用 SDS-PAGE、western-blot 及 ELISA 方法对纯化的重组蛋白特性进行了分析。结果表明,PCR 扩增出 pIgR 开放阅读框(ORF)基因全长为 1005 bp,所构建的 pET-32(a)-pIgR 重组质粒经 PCR 和双酶切鉴定含有 ORF 全长基因。SDS-PAGE 结果表明,表达的目的蛋白相对分子质量为 58 kDa,与理论预期值一致,IPTG 诱导 6h 后表达量趋于稳定,经亲和层析纯化得到高纯度的重组蛋白。Western-blot 结果表明,重组 pIgR 能够与鼠抗 His-tag 单克隆抗体发生特异性反应;ELISA 结果表明重组 pIgR 能够与牙鲈 IgM 发生特异性结合。本研究获得了纯化的重组 pIgR,证明其具有 IgM 结合活性,为下一步研究牙鲈 pIgR 的转运机制及在黏膜免疫防御中的作用机理提供了分子基础。

关键词 牙鲈;多聚免疫球蛋白受体;基因克隆;原核表达;黏膜免疫

中图分类号 Q953 **doi:** 10.11693/hyhz20130500065

多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)是主要组织相容性复合物(MHC)家族中的重要成员,是由黏膜上皮细胞合成的一种多肽,通常与分泌型多聚免疫球蛋白(IgA 或 IgM)形成复合物,有时也以游离型存在(张春刚等,2008)。哺乳动物中,在黏膜局部占主导作用的免疫球蛋白是 IgA, pIgR 可以与多聚 IgA 或 IgM 结合,介导多聚免疫球蛋白尤其是多聚 IgA 的跨上皮细胞转运和分泌,发挥 IgA 在黏膜屏障中局部清除病原体和毒素的作用。硬骨鱼的皮肤及肠道和哺乳动物的肠道一样,通过 pIgR 转运 IgM 或 IgT 进入黏膜中,这为鱼类黏膜免疫系统的特异性免疫提供了有力证据(Hamuro *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2010)。

在硬骨鱼中,有关河豚(*Takifugu rubripes*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*) pIgR 的研究已有报道(Hamuro *et al*, 2007; Rombout *et al*, 2008; Feng *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010; Tadiso *et*

al, 2011); GenBank 中可查到斑马鱼(*Danio rerio*)和牙鲈(*Paralichthys olivaceus*) pIgR 氨基酸序列。哺乳动物的 pIgR 包含 5 个免疫球蛋白样功能域(Ig-like domain, D1—D5),鸟类和两栖类 pIgR 含有 4 个免疫球蛋白样功能域(Wieland *et al*, 2004; Braathen *et al*, 2007),而硬骨鱼类 pIgR 仅包含 2 个对应于哺乳动物 D1 和 D5 的免疫球蛋白样功能域(Hamuro *et al*, 2007; Rombout *et al*, 2008)。但是,这种小分子量 pIgR 可以结合硬骨鱼类 IgM,并且 pIgR 基因在鱼皮肤上皮细胞、肠和肝细胞等有较高的表达水平(Hamuro *et al*, 2007)。

pIgR 作为重要的黏膜免疫系统的受体分子,由其介导的分泌型抗体的转运过程在生物体抵御病原体的粘附、入侵过程中起着相当重要的作用,是多聚免疫球蛋白发挥黏膜防御功能的必要条件。鱼类 pIgR 的研究不仅为鱼类 Ig 的转运提供直接证据,而且在鱼类养殖中具有一定的应用潜力(Hamuro *et al*, 2007)。牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)作为我国传统的名贵商品鱼和出口创汇重要养殖品种之一,到目前

* 国家自然科学基金项目资助,31072232 号,31172429 号;国家重点基础研究发展规划(973)项目资助,2012CB114406 号。
许国晶,博士, E-mail: guojingxu18@sina.cn

通讯作者:战文斌,教授,博士生导师, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

收稿日期:2013-06-15, 收修改稿日期:2013-08-18

为止尚未见关于其 pIgR 的研究报道。本文拟通过 PCR 技术扩增获得牙鲈 pIgR 基因全长开放阅读框 (ORF), 研究 pIgR 基因在大肠杆菌中的表达, 通过 SDS-PAGE、western-blot 及 ELISA 对 pIgR 基因表达产物进行验证, 为进一步研究 pIgR 的转运机制及深入了解其在粘膜免疫防御中的作用机理提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

健康牙鲈购自山东胶南牙鲈鱼养殖场, 平均体长 20cm, 平均体重 30g。于实验室内 80cm×50cm×40cm 的玻璃钢水槽中暂养, 水温 (20 ± 0.5)°C, 连续充气, 每日换水一次, 换水量 1/3—1/2, 暂养 7 d 后用于实验。

感受态细胞 DH5 α 购自 Transgen 公司; pET-32(a) 表达载体及表达菌株 *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) 购自 Novagen 公司; PMD18-T 载体、DNA 聚合酶、限制酶 *EcoR* I 和 *Not* I、T4DNA 连接酶、DNA 凝胶纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; IPTG 购自 INALCO 公司; 质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒购自宝生物; AP 标记羊抗小鼠抗体购于 SIGMA 公司; 鼠抗 His-tag 单克隆抗体购自北京华大蛋白公司。

鼠抗牙鲈血清免疫球蛋白的单克隆抗体由本实验室制备 (Li *et al.*, 2007), 牙鲈 IgM 参照 Li *et al.* (2007) 的硫酸铵盐析和离子交换柱层析法进行纯化。

1.2 牙鲈 pIgR 开放阅读框 cDNA 的克隆

根据牙鲈 pIgR (GenBank: HM536144) 开放阅读框 cDNA 序列和表达载体 pET-32(a) 的多克隆位点序列, 设计了一对特异引物, 由上海生物工程技术有限公司合成。为便于基因的克隆及构建表达载体等后续工作, 在引物中引入了 *EcoR* I 和 *Not* I 的酶切位点 (划线表示)。pIgR-1: 5'-CCGGAATTCATGGCGCAACTCTTCACACTC-3'; pIgR-2: 5'-TTTTCTTTTGGCGCCGCTCAGTGCATAAAAACATCCTG-3'。从牙鲈肝脏中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 合成第一链和进行 PCR 扩增, PCR 程序为 94°C 预变性 5min, 30 个循环扩增 (94°C, 50s; 58°C, 50s; 72°C, 90s), 72°C 延长 10min。扩增产物纯化后连到 pMD18-T 载体上, 转化感受态 DH5 α , 抗生素和菌落 PCR 筛选重组子, 测序。

1.3 原核表达质粒的构建及鉴定

以 *EcoR* I 和 *Not* I 分别双酶切 pET-32(a) 和序列正确的 pMD18-T-pIgR 质粒 DNA, 切胶回收纯化后, 以 T4DNA Ligase 连接片段, 构建成重组表达质粒 pET-32(a)-pIgR, 转化感受态表达菌株 *E. coli* BL21

(DE3), 菌落 PCR 筛选重组子, 并少量制备质粒 DNA, 以 *EcoR* I 和 *Not* I 对产物双酶切筛选和鉴定阳性重组质粒。

1.4 pIgR 重组蛋白的诱导表达

挑取阳性重组菌 BL21 的单菌落接种至 4mL LB 液体培养基中 (含 100 μ g/mL AMP), 37°C 振荡培养过夜, 次日以 10% 的接种量转入 5mL 的 LB 培养基中 (含 100 μ g/mL AMP), 培养至 A₆₀₀ 约 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度为 1mg/mL) 进行诱导, 继续培养 10 h, 每隔 2 h 取 1mL 菌液作为检测样品, 利用 SDS-PAGE 确定最佳诱导时间。大量诱导菌液 100mL, 6000 g 离心 10min 收集菌体, 用 PBS 重悬后超声破碎 4min (Sonics & Materials; 振幅 39%; pulse on, 3s; pulse off, 3s), 6000 g 离心收集沉淀, 以 SDS-PAGE 鉴定表达结果。

1.5 表达产物的纯化

收集经 IPTG 诱导的细菌培养物, 6000 g 离心 10min; 用缓冲液 A (50mmol/L; Tris-HCl, 2mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, pH 8.0) 6000 g 离心洗涤 2 次, 每次 10min; 将菌体细胞用缓冲液 B (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1% NP-40, pH 8.0) 重悬, 反复冻融 5 次后将菌液分装于 10mL 离心管, 每管 6mL, 然后于冰浴条件下进行超声破碎 8min (Sonics & Materials; 振幅 39%; pulse on, 4s; pulse off, 1s), 1500 g 离心 30min 收集包涵体沉淀; 亲和层析进一步纯化重组蛋白: 以 Ni 离子螯合的亲和层析柱 (HisTrap HP 1mL, GE) 对重组蛋白进行纯化, 以 binding buffer (20mmol/L Na₃PO₄, 0.5mol/L NaCl, 30mmol/L 咪唑, 8mol/L 尿素, pH 7.4) 溶解收集的包涵体, 经 0.45 μ m 的滤膜过滤后向亲和层析柱中加入样品, 经 binding buffer 平衡后, 以 elution buffer (20mmol/L Na₃PO₄, 0.5mol/L NaCl, 500mmol/L 咪唑, 8mol/L 尿素, pH 7.4) 洗脱目的蛋白, 洗脱产物经尿素浓度梯度透析后, 最后以 PBS 进行透析; 透析完成后对样品进行冷冻干燥以浓缩样品, 一部分通过 SDS-PAGE 检测纯化情况, 其它用 PBS 重悬 -80°C 保存备用。

1.6 重组蛋白的 western-blot 分析

取诱导后的菌体进行 SDS-PAGE, 以未经诱导的菌体为对照, 纯化后的重组蛋白 pIgR 为阳性对照。Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) 转移至 PVDF 膜上 (恒压 30 V 转移 2 h), 以封闭液 (0.01mol/L pH 7.4 的 PBS, 含 5% 脱脂奶粉) 封闭过夜, 加鼠抗 His-tag 单克隆抗体, 37°C 反应 1 h, PBST 洗 3 次; 再加 AP 标记的

羊抗鼠 IgG, 1 : 5000 稀释, 37°C 反应 1 h, PBST 洗 3 次后, 放入新鲜配制的 NBT/BCIP 显色液中, 室温显色 30min 后水洗终止反应。

1.7 ELISA 检测重组蛋白与 IgM 的结合

以纯化的牙鲈 pIgR 重组表达蛋白包被酶标板, 每孔 100 μ L, 包被过夜; 然后每孔加入 200 μ L 含 4%BSA 的 PBS, 37°C 封闭 1h, PBST 洗涤 3 次后, 加入纯化的牙鲈 IgM 孵育 4h; 同上洗涤 3 次后, 加入鼠抗牙鲈血清 Ig 单克隆抗体, 37°C 孵育 1h; 再加 AP 标记的羊抗鼠 IgG, 1 : 5000 稀释, 37°C 反应 1h, PBST 洗 3 次后, 加入 PNPP 显色液 100 μ L, 暗处反应 15min, 以 2mol/L H₂SO₄ 终止显色, 用酶标仪检测各孔 405nm 波长处的 OD 值, 检测孔与阴性对照的 OD 值比值大于 2 为阳性。以包被 His 标签蛋白代替牙鲈 pIgR 重组表达蛋白作为阴性对照; 另外, 以 PBS 代替纯化的牙鲈 IgM 作为阴性对照。

2 结果

2.1 牙鲈 pIgR 基因开放阅读框的克隆

以牙鲈肝脏的总 RNA 作模板, RT-PCR 结果显示, 在 1005bp 处扩增出特异性条带(图 1)。测序结果表明, pIgR 开放阅读框 cDNA 与报道的牙鲈 pIgR 开放阅读框 cDNA 序列(GenBank: HM536144)有两个碱基差异, 但推断的氨基酸序列完全一致, 所以可以用于表达。

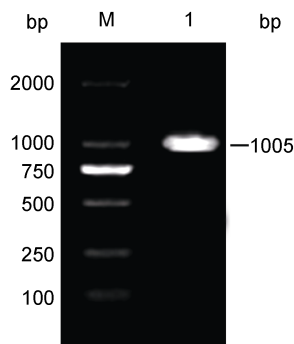


图 1 牙鲈 pIgR 开放阅读框 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR product of pIgR ORF gene
M: DNA marker; 1. pIgR ORF 的 PCR 产物

2.2 表达载体的构建及筛选

以 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切含有 pIgR 基因的 pMD18-T, 回收目的基因片段, 插入 pET-32(a)载体的相同酶切位点得到重组表达质粒 pET-32(a)-pIgR, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 得到重组菌

BL21(DE3)/pET-32(a)-pIgR。在转化平板上随机挑取 10 个菌落进行菌落 PCR 检测, 结果均为阳性, 选取其中 1 个进行扩大培养, 收集培养菌后利用质粒提取试剂盒提取质粒, 利用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行酶切, 将酶切产物和酶切前的质粒进行琼脂糖凝胶电泳, 结果表明质粒经过酶切后, 得到一条分子量在 1005bp 左右的基因条带, 与表达的目的基因相符(图 2)。

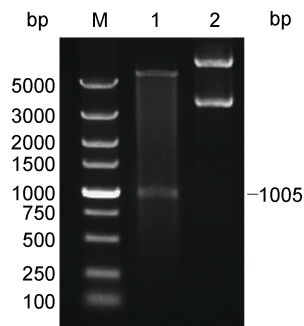


图 2 表达载体 pET32a-pIgR 的双酶切检测

Fig.2 Double-enzyme digestion of recombinant pET32a-pIgR
M: DL5000 marker; 1. 阳性克隆菌质粒的双酶切产物; 2. 抽提的阳性克隆菌质粒

2.3 重组牙鲈 pIgR 的诱导表达、纯化及 SDS-PAGE 分析

分别取 IPTG 诱导 0h, 2h, 4h, 6h, 8h 及 10h 后的表达产物经 SDS-PAGE, 结果显示, 与未经诱导表达的大肠杆菌相比, 诱导后的重组质粒 pET-32(a)-pIgR 的细胞裂解液在 58kDa 处有一条特异性蛋白条带, 目的基因编码 335 个氨基酸, 表达的蛋白片段理论分子量为 37kDa, 质粒 pET-32(a)的标签蛋白大小则约为 21kDa 左右, 结果与理论大小相符, 并且 IPTG 诱导 6h 后蛋白表达量趋于稳定(图 3)。在优化表达条件后, 将经 IPTG 诱导表达 6h 的细菌裂解液及表达产物经亲和层析纯化后的最终产物进行 SDS-PAGE, 电泳结果显示获得了纯度很高的目的表达蛋白, 无其它明显杂带存在(图 4)。

2.4 重组蛋白 pIgR 的 western-blot 分析

Western-blot 结果显示阳性对照及重组菌株在 58kDa 处均有一条明显的特异条带(图 5), 而阴性对照即未经诱导的菌株没有出现相应的条带(图 5), 表明重组蛋白可与鼠抗 His-tag 单克隆抗体发生特异性反应, 与预期结果一致。

2.5 ELISA 检测重组 pIgR 与 IgM 的结合

应用抗血清 Ig 抗体, 通过 ELISA 检测牙鲈 pIgR 重组表达蛋白与 IgM 的结合活性, 结果在检测孔

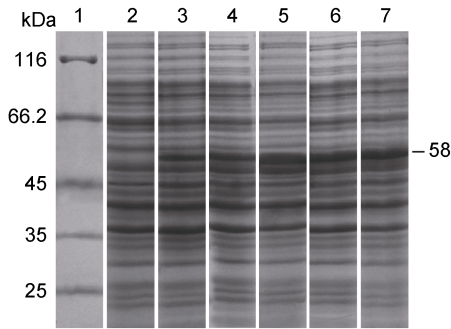


图3 重组蛋白 pIgR 的诱导时间分析

Fig.3 Effect of induction time on the expression of recombinant pIgR

1. 蛋白 Marker; 2—7. 分别诱导 0h, 2h, 4h, 6h, 8h 及 10h 的表达情况

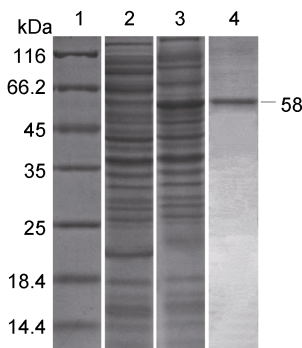


图4 重组蛋白 pIgR 的纯化

Fig.4 The purification of the recombinant pIgR

1. 蛋白 Marker; 2. 未经诱导的; 3. 诱导 6h; 4. 纯化产物

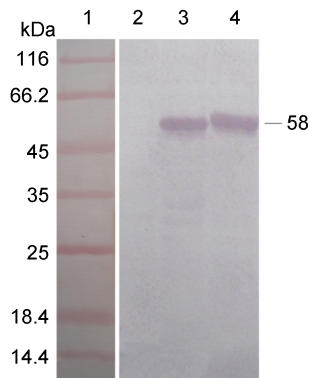


图5 重组蛋白 pIgR 的 western blot 分析

Fig.5 Western blot of the recombinant pIgR

1. 蛋白 Marker; 2. 未经诱导的; 3. 诱导 6h; 4. 纯化产物

405nm 处的 OD 值达 0.5790, 与阴性对照孔的 OD 值 (His 标签蛋白: O.D.=0.0911; PBS: O.D.=0.0787) 比值明显大于 2, 说明重组 pIgR 与 IgM 发生了特异性结合(图 6)。

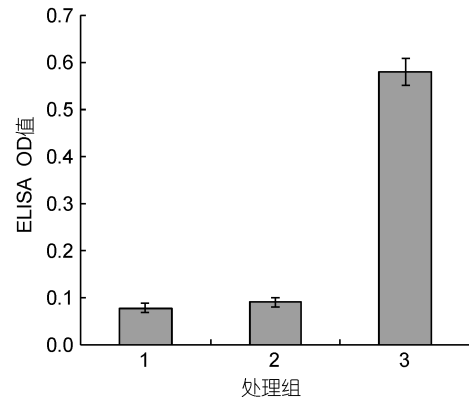


图6 ELISA 检测 pIgR 与 IgM 的结合

Fig.6 Detection of the binding of pIgR to IgM *in vitro* by ELISA

1. 以 PBS 代替抗 Ig 单抗的阴性对照; 2. 包被 His 标签蛋白作为阴性对照; 3. 利用抗 Ig 单抗检测 IgM 与重组 pIgR 的结合

3 讨论

全基因组序列分析显示, 牙鲈 pIgR ORF 基因片段全长 1005bp, 编码 335 个氨基酸残基 (GenBank: HM536144)。本文通过 PCR 技术, 扩增 pIgR ORF 基因片段为 1005bp, 有两个碱基差异, 但推断的氨基酸序列完全一致, 可以用于表达。大肠杆菌表达重组蛋白时常形成包涵体, 而对包涵体的变性、复性等操作会影响重组蛋白生物活性。因此, 在构建表达载体时, 将 pIgR 基因与表达载体 pET-32(a) 中 N 端的 6×His-tag 进行融合表达, 便于后续对重组蛋白进行表达分析和分离纯化等。重组质粒进行诱导表达时, 6×His-tag 与外源插入片段共同表达, 因而融合蛋白带有 6×His-tag。在大多数情况下, 6×His-tag 不影响重组蛋白的结构和功能, 可以利用该蛋白标签通过 Ni-NTA 柱纯化便于融合蛋白的纯化(刘臻等, 2010)。本文构建的牙鲈 pIgR ORF 表达载体 pET-32(a)-pIgR 转化表达受体菌后, 经 IPTG 37°C 诱导 6h 实现了高效表达, 获得分子量大小为 58 kDa 的融合蛋白, 与推测的理论产物大小一致, 说明牙鲈 pIgR ORF 能够在 BL21(DE3) 大肠杆菌中成功表达。6×His-tag 标签序列蛋白大小为 21kDa, 因此得出目的蛋白大小为 37kDa, 分子量与虹鳟 pIgR 表达蛋白 38 kDa 接近(Zhang *et al*, 2010), 大于斑马鱼 pIgR 原核表达蛋白 30.75 kDa(王辉, 2007)、鲤鱼 pIgR 原核表达蛋白 29kDa(王磊, 2009), 及斜带石斑鱼 pIgR 原核表达蛋白 28kDa(冯丽娜, 2009), 但整体相差不大。经过蛋白分析发现, 牙鲈 pIgR 具有与斑马鱼、鲤鱼、虹鳟、河豚及斜带石斑鱼相同的结构, 都

具有信号肽, 2个免疫球蛋白功能域, 一段跨膜区以及胞内区(pIgR基因序列及结构特征数据另文发表)。为进一步鉴定该表达系是否能正确表达目的蛋白, 本文以未转染pET-32(a)-pIgR的*E. coli* BL21(DE3)作为对照, 应用Western-blot验证重组蛋白可与鼠抗His-tag单克隆抗体发生特异性反应, 证明了重组蛋白表达的正确性。

哺乳动物黏膜表面的pIgR在体液免疫中发挥重要作用, 位于黏膜下的IgA与穿过表皮屏障的抗原结合, 通过pIgR介导的运送机制, 将抗原排出体外, 或通过类似方式, 阻断细胞内病毒的合成和组装(张春刚等, 2008)。本研究构建的牙鲆pIgR ORF片段包括胞外区2个免疫球蛋白功能域, 即配体结合区, 具有结合Ig功能(Hamuro *et al*, 2007)。为了进一步验证重组牙鲆pIgR具有结合Ig的活性, 本文在纯化pIgR表达蛋白的过程中, 首先将变性条件下的蛋白进行了透析, 梯度降低了尿素的浓度, 从而使变性的蛋白能够缓慢复性, 甚至会恢复到天然构象, 从而更好的模拟天然状态的pIgR。本研究通过ELISA方法应用抗血清Ig单克隆抗体研究纯化的重组pIgR与IgM的结合关系, 发现牙鲆pIgR重组表达蛋白具有IgM结合活性。这与Hamuro等(2007)、Feng等(2009)及Zhang等(2010)的研究结果一致。在河豚中, Hamuro等(2007)通过非变性电泳发现IgM与pIgR复合物; Feng等(2009)通过流式细胞术检测发现斜带石斑鱼重组pIgR具有结合Ig的能力; Zhang等(2010)也在虹鳟肠黏液中发现了IgT与pIgR复合物, 说明pIgR与Ig的转运存在密切联系。

本文通过PCR技术克隆了牙鲆pIgR基因, 进行原核表达, 并通过western-blot和ELISA方法, 初步验证了pIgR基因的功能。作者后续将应用纯化的重组pIgR, 制备抗血清及单克隆抗体, 通过免疫荧光及免疫组化等技术分析牙鲆pIgR在黏膜免疫系统中的分布, 通过免疫印迹技术等分析pIgR与Ig的结合位点, 为深入研究pIgR的转运机制及了解pIgR在黏膜免疫防御中的作用机理奠定基础。

参 考 文 献

- 王 辉, 2007. 斑马鱼多聚免疫球蛋白受体(zpIgR)基因的克隆. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 46—49
- 王 磊, 2009. 鲤鱼多聚免疫球蛋白受体(cpIgR)功能的研究. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 27—29
- 冯丽娜, 2009. 斜带石斑鱼多聚免疫球蛋白受体基因的克隆和功能分析. 广州: 中山大学博士学位论文, 93—97
- 刘 臻, 罗小华, 鲁双庆等, 2010. 鳊(*Siniperca chuatsi*)生长激素基因克隆和原核表达. 海洋与湖泊, 41(3): 365—370
- 张春刚, 王加启, 刘光磊等, 2008. 动物多聚免疫球蛋白受体研究概况. 中国畜牧兽医, 35(7): 49—51
- Braathen R, Hohman V S, Brandzaeg P *et al*, 2007. Secretory antibody formation: conserved binding interactions between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J Immunol*, 178: 5682—5686
- Brandtzaeg P, 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol*, 293: 3—15
- Feng L N, Lu D Q, Bei J X *et al*, 2009. molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp Biochem Physiol B*, 154: 282—289
- Hamuro K, Suetake H, Saha N R *et al*, 2007. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *J Immunol*, 178: 5682—5689
- Li Q, Zhan W B, Xing J *et al*, 2007. Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 23: 982—990
- Rombout J H W M, van der Tuin S J L, Yang G *et al*, 2008. Expression of the polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinu scarpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 24: 620—628
- Tadiso T M, Sharma A, Hordvik I, 2011. Analysis of polymeric immunoglobulin receptor- and CD300-like molecules from Atlantic salmon. *Mol Immunol*, 49(3): 462—473
- Wieland W H, Orzaez D, Lammers A *et al*, 2004. A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochem J*, 380: 669—676
- Zhang Y A, Salinas I, Li J *et al*, 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol*, 11: 827—835

CLONING AND EXPRESSION OF POLYMERIC IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR IN FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

XU Guo-Jing, SHENG Xiu-Zhen, ZHAN Wen-Bin

(The key Laboratory of Mariculture, ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) is one of the most important mucosal factors mediating the transecytosis of polymeric immunoglobulins (pIgs) to protect the organism. In this paper, the full-length open reading frame (ORF) of pIgR gene was cloned and expressed by PCR and by constructing prokaryotic expression vector, and then identified by SDS-PAGE, western-blotting, and ELISA. The results show that PCR amplified an ORF of 1005bp. Using PCR and restriction digestion, the constructed pET-32(a)-pIgR recombinant plasmid was identified containing full-length ORF gene. SDS-PAGE shows that the target protein had relative molecular mass of 58 kDa, which is consistent with the theoretical value, and achieved stable expression when induced by IPTG for 6 h. After purified by affinity chromatography, recombinant protein was obtained in high purity with no other band in SDS-PAGE. Western-blotting shows that recombinant protein reacted specifically with anti-His-tag mouse monoclonal antibody, and ELISA results show that recombinant pIgR could bind with the IgM. The ORF was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3); and the purified recombinant protein displayed binding ability to IgM. Therefore, flounder pIgR may be involved in the pIgs transport, which provides a molecular basis for the research on the roles of fish pIgR in mucosal immunity.

Key words *Paralichthys olivaceus*; polymeric immunoglobulin receptor; gene cloning; prokaryotic expression; mucosal immune