



草鱼IL-10阳性细胞的初步分析

刘琴 贾钊 陈康勇 朱晓真 王梓璇 陈静 王俊亚 邹钧

上海海洋大学



Introduction

白细胞介素（interleukin, IL）10是IL-10家族成员之一，最初称为细胞因子合成抑制因子（cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF）[1]，主要由2型先天淋巴细胞（Type 2 innate lymphoid cell, ILC2）或辅助性2型T细胞（T help 2 cell, Th2）分泌，具有广泛的免疫调控作用[2]，能够抑制1型辅助性T细胞（T help 1 cell, Th1）分泌干扰素 γ （interferon gamma, IFN- γ ）。此外，IL-10也可由B细胞、嗜酸性粒细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞、上皮细胞、肿瘤细胞等多种细胞产生[3-4]，而IL-10由何种细胞产生，很大程度取决于刺激物引发的免疫反应强度和作用部位[5]。

Methods

- 1、利用大肠杆菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）表达系统制备了高纯度的草鱼（*Ctenopharyngodon idella*, *Ci*）IL-10重组蛋白，免疫小鼠后获得单克隆抗体，通过免疫印迹（Western Blotting）、激光共聚焦显微镜分析和流式细胞术对抗体进行鉴定。
- 2、脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）、草鱼白细胞介素1 β （IL-1 β ）刺激草鱼性腺细胞系（GCO）36小时，利用单克隆抗体对细胞进行免疫荧光染色分析。

Results

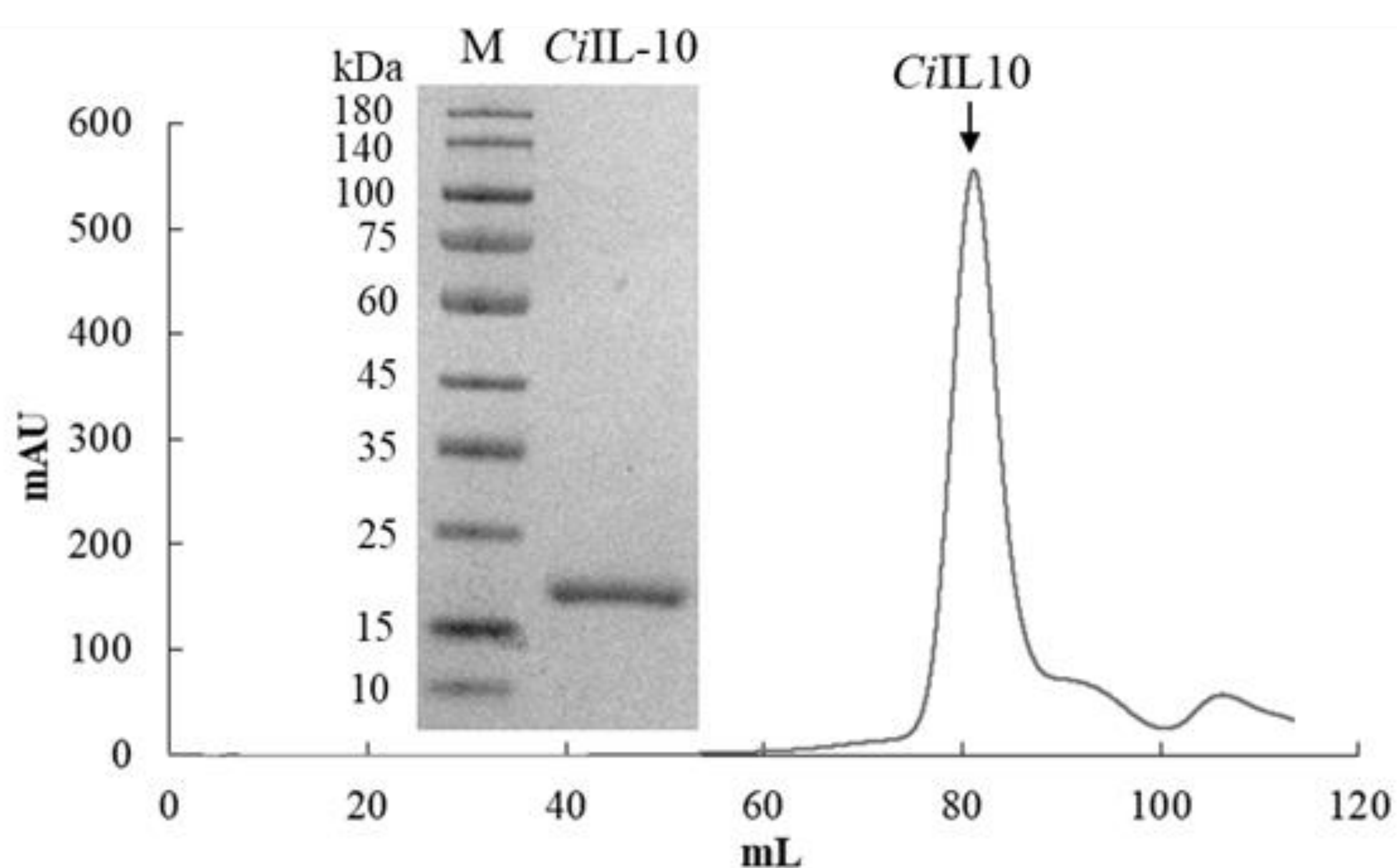


图1 草鱼IL-10重组蛋白表达与纯化

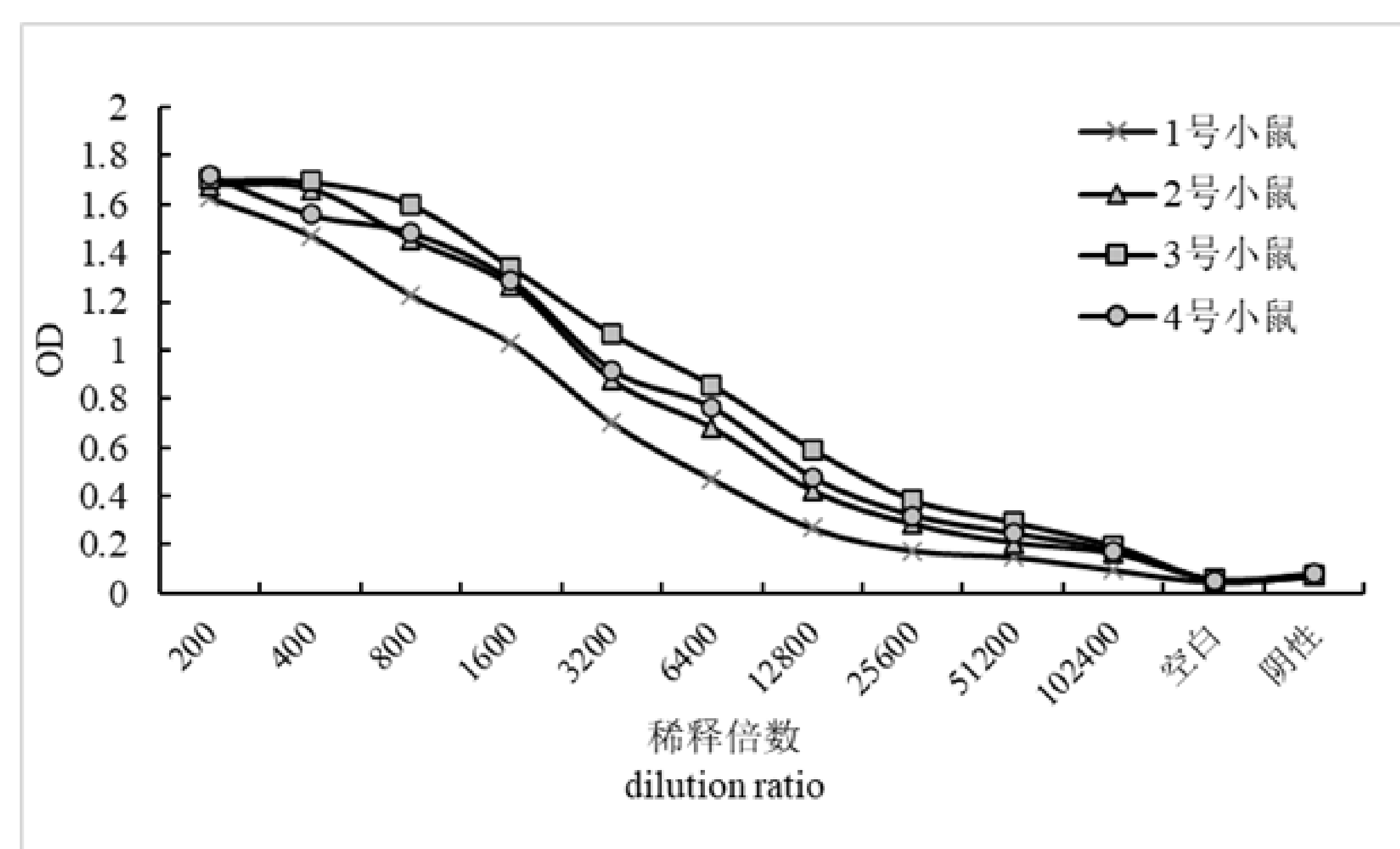


图2 免疫小鼠血清中抗体效价的测定

表1 抗体亚型鉴定

抗体编号 Antibody number	OD 值 OD value	抗体亚型 Antibody subtype
GC4-IL10	0.240	IgG1
GC5-IL10	0.585	IgG2b
GC6-IL10	0.410	IgG2b
GC10-IL10	0.208	IgG1

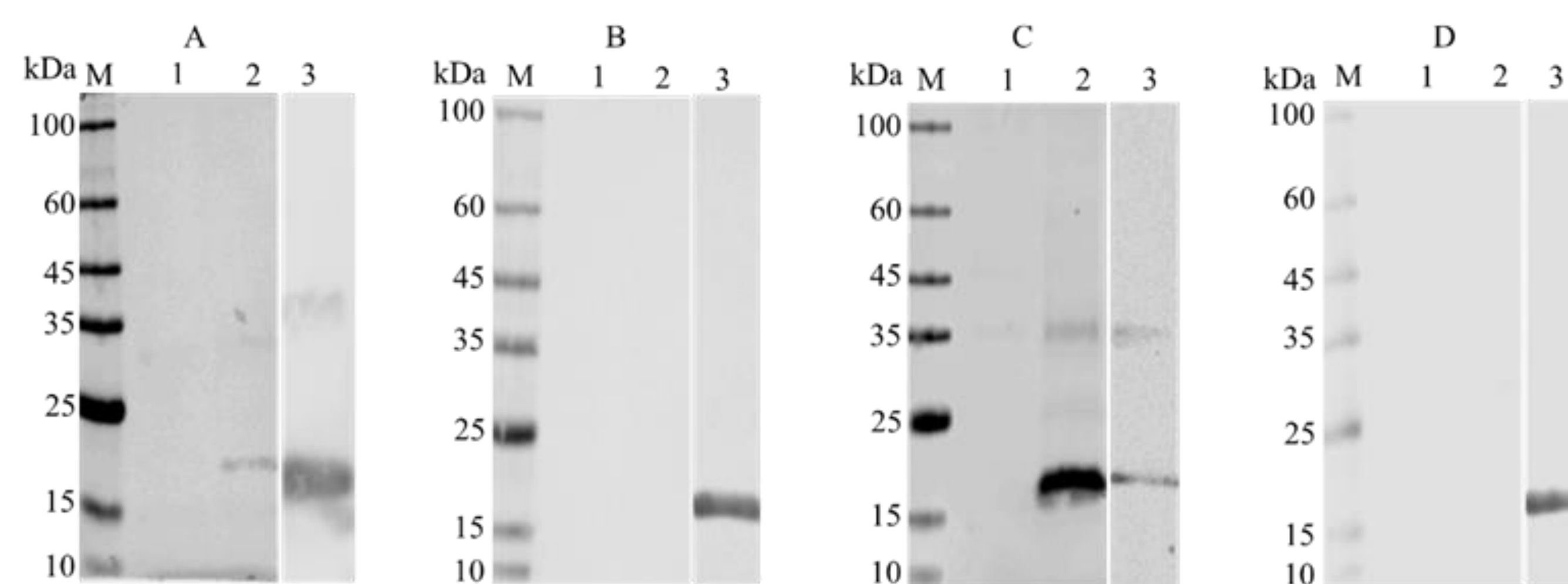


图3 Western Blotting验证单克隆抗体

A.GC4-IL10; B.GC5-IL10; C.GC6-IL10; D.GC10-IL10

1. pCDNA3.4; 2. pCDNA3.4-CiIL-10; 3. IL-10原核重组蛋白

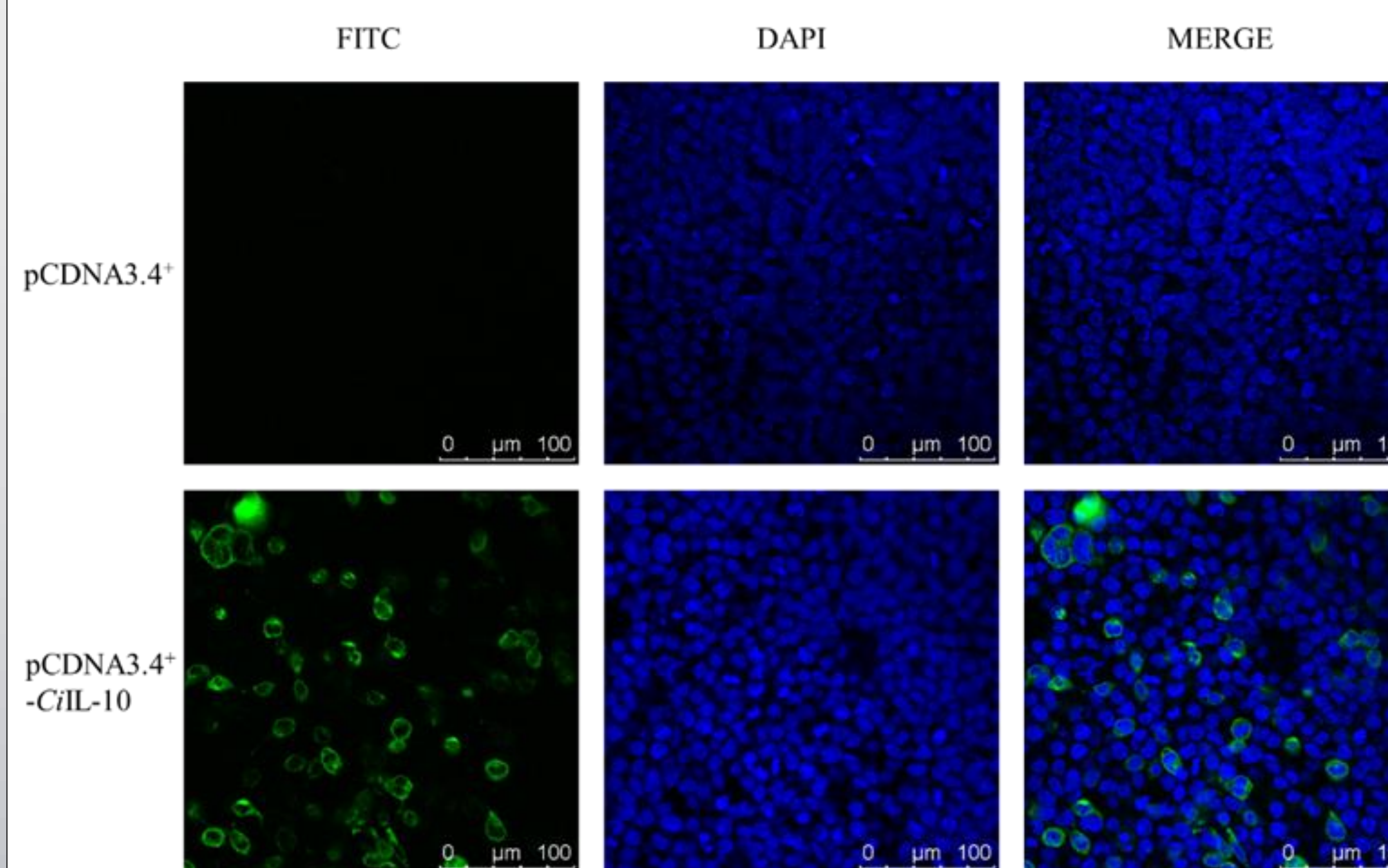


图4 抗体特异性免疫荧光分析

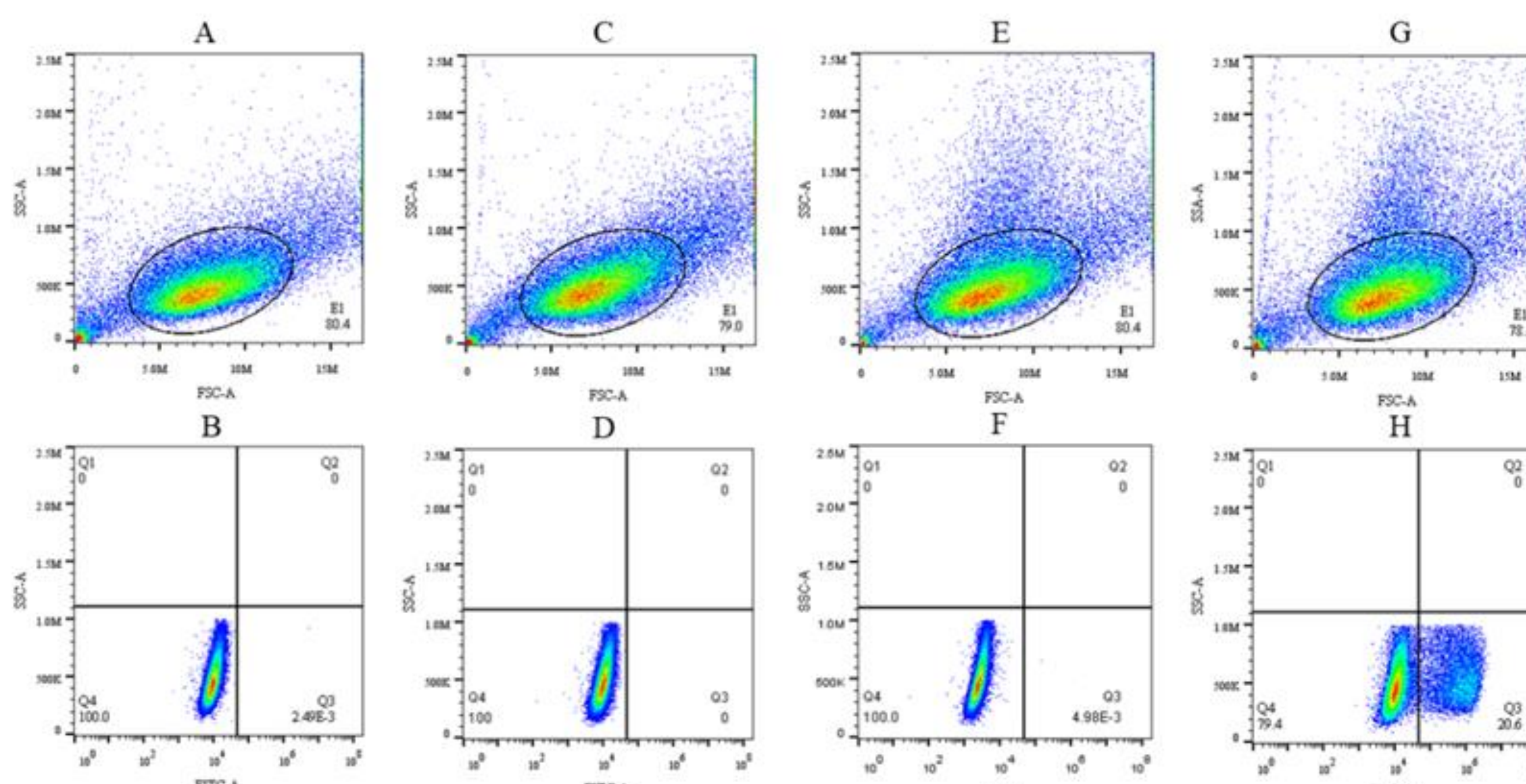


图5 GC6-IL10抗体的流式细胞术分析

A、B.阴性对照，未转染细胞；C、D.转染pCDNA3.4；E、F.同型抗体阴性对照；G、H.转染pCDNA3.4-CiIL-10

Conclusions

本研究利用大肠杆菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）表达系统制备了高纯度的草鱼（*Ctenopharyngodon idella*, *Ci*）IL-10重组蛋白，免疫小鼠后获得单克隆抗体，通过免疫印迹（Western Blotting）、激光共聚焦显微镜分析和流式细胞术对抗体进行鉴定，发现获得的单克隆抗体能特异识别大肠杆菌和HEK293细胞中表达的草鱼IL-10重组蛋白。脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）、草鱼白细胞介素1 β （IL-1 β ）刺激草鱼性腺细胞系（GCO）36小时，利用单克隆抗体对细胞进行免疫荧光染色分析，在激光共聚焦显微镜下观察到单克隆抗体能与天然草鱼IL-10结合，但是IL-10阳性细胞数量与对照组相比无明显增多。

Results

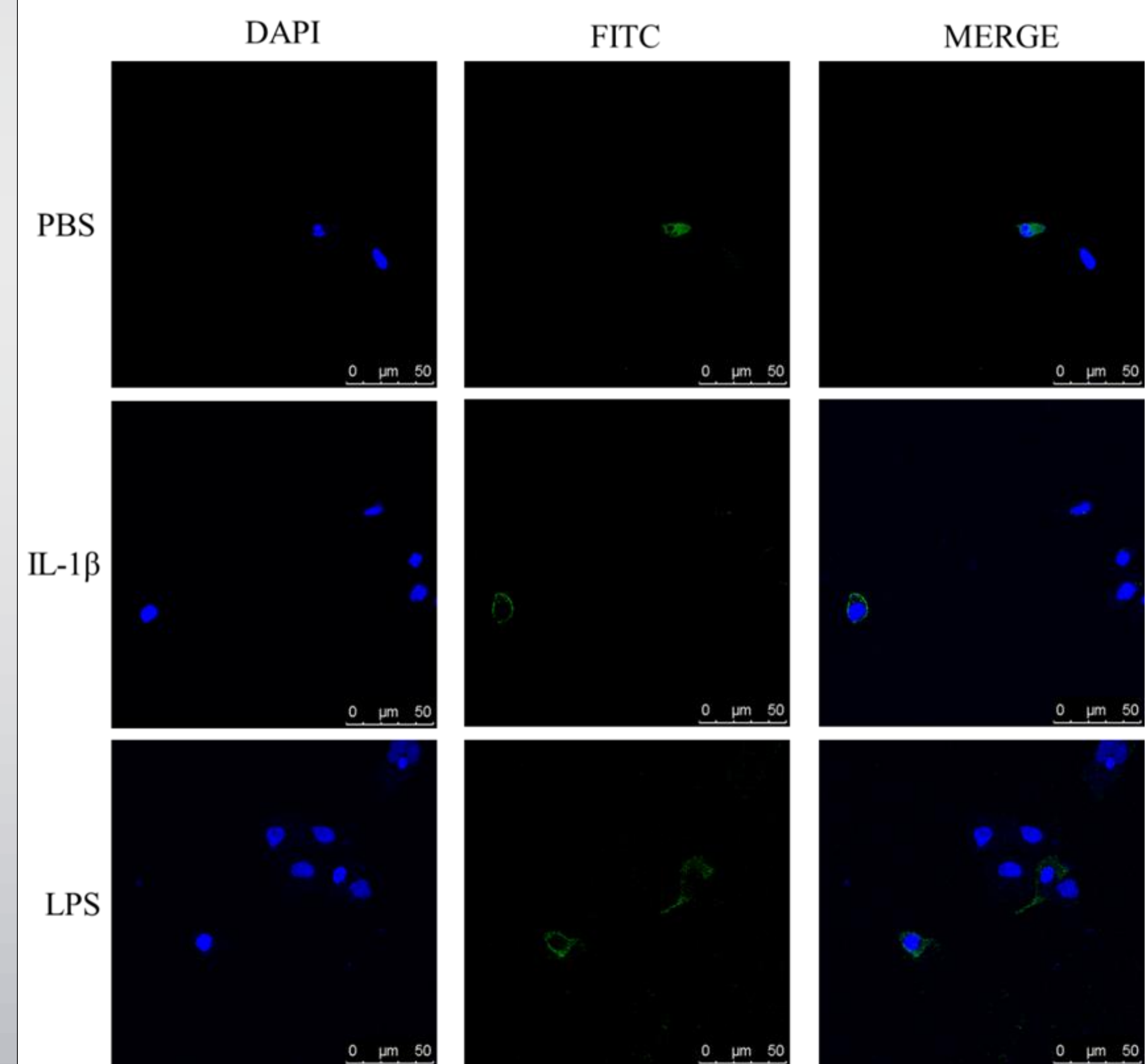


图6 产生IL-10的细胞免疫荧光分析

Bibliography

- [1] Fiorentino D F, Bond M W, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170(6): 2081-95.
- [2] Hirahara K, Aoki A, Kiuchi M, et al. Memory-type pathogenic Th2 cells and ILC2s in type 2 allergic inflammation [J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2021, 147(6): 2063-2066.
- [3] Ding Y Z, Fu S, Zamarin D, et al. Interleukin-10 [M]. *The Cytokine Handbook*, 2003, 1:603-625.
- [4] Ryan J J, Mohit K, Daniel B, et al. Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease [J]. *Critical Reviews in Immunology*, 2007, 27(1):15-32.
- [5] 王丽菲. 尼罗罗非鱼白介素10的基因克隆与表达分析[D]. 广东: 华南师范大学, 2016, 10-11.