

颜露玲, 付钰广, 唐雨童, 等. 猪免疫球蛋白 J 链表达及抗血清的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 45-52.

YAN L L, FU Y G, TANG Y T, et al. Expression of porcine immunoglobulin joining chain protein and preparation of its antiserum [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 45-52.

猪免疫球蛋白 J 链表达及抗血清的制备

颜露玲^{1,2}, 付钰广², 唐雨童², 李文杰², 刘光亮^{2*}, 王衡^{1,3*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 中国农业科学院兰州兽医研究所/动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046;

3. 华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 旨在制备猪免疫球蛋白 J 链抗血清, 为研究 J 链的免疫学功能提供材料。运用 PCR 扩增 J 链开放阅读框, 并将其克隆至原核表达载体 pET30a, 选择测序成功的 pET30a-J 重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中进行蛋白表达验证; 将 J 链与弗氏完全佐剂混合后经背部皮下免疫新西兰大白兔制备抗血清; 采用 ELISA、Western blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 对获得的抗血清进行功能验证。结果: 猪免疫球蛋白 J 链在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 经变性复性后通过 NI-NTA 亲和层析的方法纯化出纯净的目的蛋白; ELISA 检测结果显示, 四免后兔血清中抗体效价可达 1:6 400; Western blot 结果显示, 获得的抗血清能与原核表达的 J 链特异性结合; 为进一步验证抗血清的反应性, 构建了 pcDNA3.1-J 重组载体, 将其转染 293T 细胞, IFA 与 Western blot 检测结果显示, 本研究制备的抗血清能与真核表达的猪免疫球蛋白 J 链特异性结合, 通过 ELISA 和 Western blot 检测抗血清与猪乳中 J 链的反应性, 结果显示能与猪乳中的 J 链反应。综上所述, 本研究成功制备出猪免疫球蛋白 J 链抗血清。

关键词: 猪免疫球蛋白 J 链; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S852.4+3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0045-08

Expression of porcine immunoglobulin joining chain protein and preparation of its antiserum

YAN Luling^{1,2}, FU Yuguang², TANG Yutong², LI Wenjie², LIU Guangliang^{2*}, WANG Heng^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, Lanzhou 730046, China;

3. National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This study was to prepare polyclonal antiserum against porcine immunoglobulin joining chain, and provide material for immunological function research on the joining chain. The open reading frame (ORF) of the J chain was amplified using PCR and was subsequently cloned into prokaryotic expression vector pET30a. The recombinant plasmid pET30a-J was successfully constructed and transformed into BL21 (DE3) competent cells to express the J chain. To generate polyclonal antiserum against the J chain, the purified J chain was mixed with complete Freund's adjuvant and administered subcutaneously on New Zealand white rabbits. Finally, ELISA, Western blot and IFA assays were performed to identify the function of the prepared antiserum. The J chain was expressed as an inclusion body in Escherichia coli, and was successfully purified using NI-NTA affinity chromatography. The antiserum titer post four immunizations was measured using ELISA, the results showed that the valid dilution was as high as 1:6 400. The Western blot analysis showed that the obtained polyclonal antiserum could bind to the J chain produced in the prokaryotic expression system. To further assess the reactivity of the prepared polyclonal antiserum, the recombinant plasmid pcDNA3.1-J was constructed and transfected into 293T cells to express the protein. The results from IFA and West-

收稿日期: 2024-12-23; 修回日期: 2025-07-31

基金项目: 甘肃省科技重大专项 (23ZDNA007); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目

第一作者: 颜露玲, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 王衡, 副教授, 主要从事重要猪病发病机制与防控方法的相关研究, E-mail: wangheng2009@scau.edu.cn; 刘光亮, 研究员, 主要从事猪消化道黏膜免疫的相关研究, E-mail: LiuGuangliang01@caas.cn.

ern blot indicated that the prepared polyclonal antiserum specifically recognized the J chain expressed in the eukaryotic cells. In addition, ELISA and Western blot were employed to detect the reactivity of the antiserum and the J chain in sow's milk, and the results indicated that the prepared antiserum specifically recognized the J chain in the milk. This study successfully prepared the polyclonal antiserum against the porcine immunoglobulin J chain, providing materials for exploration of the immunological function of the J chain protein.

Keywords: porcine immunoglobulin joining chain; prokaryotic expression; polyclonal antiserum

免疫球蛋白 (Ig) J 链由成熟的浆细胞产生, 于 1971 年在分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 和 M (sIgM) 抗体中首次被分离鉴定^[1]。免疫球蛋白 J 链基因在系统发育上表现出高度的保守性, 已发现的物种中存在 8 个保守的半胱氨酸位点^[2]。J 链除了氨基酸序列的高度保守外, 在功能方面也展现出相当程度的一致性^[3]。

免疫球蛋白 J 链仅包含一个 Ig 样结构域^[4], 蛋白质大小约为 18 kDa。与免疫球蛋白重链和轻链功能不同, J 链不具备针对特定抗原的识别能力^[5-6], 该链的主要功能是通过共价键将 2 个或多个 Ig 单体连接形成二聚体或多聚体结构, J 链 C 末端的发夹状结构能够通过疏水作用与 IgA 或 IgM 的 Fc 区域结合^[7], 可使 2 个单体 IgA 通过 J 链相连组成二聚体, 5 个单体 IgM 形成五聚体^[2]。

J 链不仅在 Ig 单体形成多聚体过程中扮演关键角色, 对分泌型抗体的分泌过程也至关重要。它通过与上皮细胞下层表达的多聚免疫球蛋白受体 (polymeric immunoglobulin receptor, PIgR) 结合形成受体配体复合物 (sIgA 前体)^[8], 随后该复合物通过内吞作用进入细胞形成囊泡, 最终经由这些囊泡运输至黏膜相关组织释放^[9]。在此过程中, PIgR 受到硫醇依赖性蛋白酶作用降解为分泌片段 (secretory component, SC)^[10], SC 通过非共价键与 IgA 二聚体结合, 形成分泌型 IgA 抗体^[11]。只有结合 J 链的二聚体才能与 PIgR 结合, 随后转运到黏膜表面执行免疫功能。有研究发现, 某些前 B 细胞^[12] 和分泌 IgG 抗体的细胞^[13] 也能表达 J 链, 这表明 J 链可能参与更广泛的免疫应答过程, 但其确切作用及机制仍待进一步探索。

鉴于目前关于 J 链的研究相对较少, J 链在 Ig 单体多聚化过程及分泌型抗体的分泌过程中十分重要, 因此本研究致力于制备猪免疫球蛋白 J 链抗血清, 为 J 链的结构特征及免疫学功能的研究提供材料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

PCR 酶购自诺唯赞公司; PCR 产物纯化试剂盒、

限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III、T4 DNA 连接酶均购自赛默飞世尔科技中国有限公司; 透析袋、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、尿素、卡那霉素、氨苄青霉素、IPTG 均购自索莱宝生物科技有限公司; 鼠源 His 标签抗体 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体和山羊抗兔 IgG 抗体购自 Invitrogen 公司; HRP 标记的山羊抗猪 IgA 抗体购自 Abcam 公司; Alexa Flour 488 标记的山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 抗体购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.2 猪免疫球蛋白 J 链原核表达载体的构建

根据 NCBI 已报道的猪免疫球蛋白 J 链基因序列 (基因号: XM_003356961.3) 设计扩增引物, 上游引物: ccgCTCGAGatgaagaactcttctctctgg (下划线为 *Xho* I 酶切位点), 下游引物: gcgAAGCTTgtcaggatagcaggaatccg (下划线为 *Hind* III 酶切位点), 并将编码 J 链的开放阅读框 (ORF) 基因和扩增引物交由擎科生物科技有限公司合成。以合成的猪免疫球蛋白 J 链 ORF 基因为模板, 利用 Vazyme P515-01 2 × Phanta[®] Max Master Mix 试剂盒扩增 J 链基因。扩增体系为 50 μL, 其中: PCR 高保真酶 25 μL, 上游和下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μL, 无酶水 22 μL, cDNA 1 μL。利用 PCR 产物纯化试剂盒将扩增的 J 链基因片段进行纯化, 之后配置 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切体系, 将 pET30a-His 载体和目的片段进行双酶切。酶切纯化后利用 T4 DNA 连接酶将目的基因连接到 pET30a-His 载体上, 25 °C 连接 2 h 后转化到 DH5α 感受态细胞中, 向转化产物中加入 1 mL LB 液体培养基, 待细菌恢复正常生长状态后涂布至 LB 固体培养基上, 次日挑取单克隆置于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中培养 4~6 h, 然后进行菌液 PCR 鉴定。阳性菌液交由擎科生物科技有限公司测序, 测序结果正确的样品提取质粒并命名为 pET30a-J。

1.3 猪免疫球蛋白 J 链的原核表达和纯化

将 pET30a-J 质粒导入到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑选单克隆并将其置于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中进行培养。当菌液达到最佳生长状态时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。

诱导 8 h 后将菌体超声裂解，分别制备上清液和沉淀蛋白样品，经 SDS-PAGE 鉴定蛋白是以可溶性或包涵体形式表达。将以包涵体形式表达的 J 链利用尿素进行变性复性后，通过 NI-NTA 亲和层析的方法进行纯化，纯化后的 J 链经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定，经 BCA 法测定蛋白浓度后分装于 -80 ℃ 冻存备用。

1.4 猪免疫球蛋白 J 链抗血清的制备

本试验涉及的所有动物均依据《中华人民共和国动物伦理程序和指导原则》严格按照良好动物规范进行处理，并得到中国农业科学院兰州兽医研究所动物管理与伦理委员会的批准（批准号：LVRIAEC-2020-030）。将纯化后的目的蛋白与弗氏完全佐剂充分乳化后免疫 1 只雌性新西兰大白兔，免疫剂量为 200 μg/只，间隔 2 周免疫 1 次，在第 2 次、第 3 次及第 4 次免疫时，J 链与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行免疫。在免疫前和每次免疫后第 10 天，采集新西兰大白兔的耳缘静脉血 200 μL，离心分离出血清，分装于 -80 ℃ 冻存。完成 4 次免疫后，经 ELISA 检测每次免疫后抗体水平的变化和抗体滴度，J 链以 100 ng/孔的量 4 ℃ 过夜包被 ELISA 板，PBST 洗 3 遍；以 200 μL/孔的 2.5% BSA 于 37 ℃ 封闭 ELISA 板 2 h，PBST 洗 3 遍；加入阴性血清及每次免疫后收集的血清于 37 ℃ 孵育 1 h，PBST 洗 3 次；加入 5 000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体于 37 ℃ 孵育 1 h，PBST 洗 3 次；加入 TMB（50 μL/孔）显色 8 min，再加入终止液（50 μL/孔）终止反应。利用酶标仪读取样品的 $OD_{450\text{nm}}$ 值。

1.5 猪免疫球蛋白 J 链真核表达载体的构建

根据 1.2 中所述方法扩增 J 链 ORF 基因，经酶切连接将 J 链基因克隆到 pcDNA3.1-His 载体中，经测序鉴定后将成功构建的重组质粒命名为 pcDNA3.1-J。

1.6 猪免疫球蛋白 J 链的真核表达鉴定

1.6.1 Western blot 鉴定猪免疫球蛋白 J 链在 293T 细胞中的表达

将 HEK-293T 细胞接种到 6 孔板中，待细胞密度达到 70% 时，按每 1 μg DNA 加入 3 μL 转染试剂 PEI 的比例配制转染液，将重组质粒 pcDNA3.1-J 转染至 HEK-293T 细胞，48 h 后处理细胞并制备蛋白样，凝胶电泳结束后将分离的蛋白转移到 0.45 μm 的 PVDF 膜上，5% 脱脂乳室温封闭 PVDF 膜 2 h，5 000 倍稀释的鼠源 His 标签 IgG 抗体作为一抗，4 ℃ 过夜孵育，5 000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠

IgG 抗体作为二抗，室温孵育 2 h，最后利用 ECL 显色液检测目的蛋白的表达水平。

1.6.2 间接免疫荧光试验（IFA）鉴定猪免疫球蛋白 J 链在 293T 细胞中的表达

将 HEK-293T 细胞接种到 48 孔板中，待细胞密度达到 70% 时，按每 1 μg DNA 加入 3 μL 转染试剂 PEI 的比例配制转染液，将重组质粒 pcDNA3.1-J 转染至 HEK-293T 细胞，转染后 36 h 弃掉 48 孔板中 HEK-293T 细胞培养液，4% 多聚甲醛固定细胞 1 h，1% Triton X-100 通透细胞 10 min，2.5% BSA 封闭 1 h，500 倍稀释的鼠抗 His 标签 IgG 抗体作为一抗，4 ℃ 过夜孵育，1 000 倍稀释的 Alexa Flour 488 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗，室温孵育 1 h，DAPI 避光染核 10 min，利用徕卡荧光显微镜检测目的蛋白的表达情况。

1.7 猪免疫球蛋白 J 链抗血清反应性验证

1.7.1 猪免疫球蛋白 J 链抗血清与 293T 细胞表达的 J 链反应性验证

按照 1.6 中所述使用 PEI 将重组质粒 pcDNA3.1-J 转染至铺有 HEK-293T 细胞的 6 孔板中，48 h 后处理细胞并制备蛋白样，凝胶电泳结束后将蛋白湿转到 PVDF 膜上，转印完成后用 5% 脱脂乳进行封闭，2 000 倍稀释的抗 J 链血清作为一抗 4 ℃ 过夜孵育，5 000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 2 h，最后添加 ECL 检测制备的抗血清与生理状态的猪免疫球蛋白 J 链的反应性。转染后 36 h 弃掉细胞培养液，按照 1.6 中所述方法进行固定，通透，封闭，500 倍稀释的抗 J 链血清作为一抗 4 ℃ 过夜孵育，1 000 倍稀释的 Alexa Flour 488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体作为二抗，室温孵育 2 h，DAPI 避光染核 10 min，置于荧光显微镜下观察荧光信号强度。

1.7.2 猪免疫球蛋白 J 链抗血清与猪乳中 J 链的反应性验证

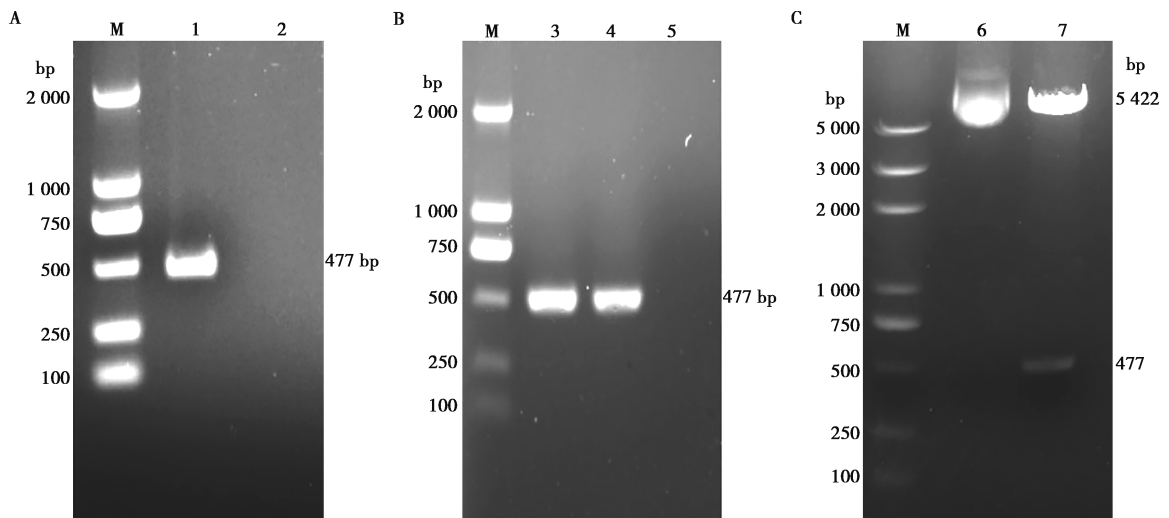
为进一步验证所制备的抗血清与猪免疫球蛋白 J 链的反应性，分别采用 ELISA 和 Western blot 检测制备的抗血清与猪乳中 J 链的反应。将本实验室保存纯化的猪流行性腹泻病毒（PEDV）S1 蛋白以 100 ng/孔的量 4 ℃ 过夜包被 ELISA 板，PBST 洗 3 遍；以 200 μL/孔的 2.5% BSA 于 37 ℃ 封闭 ELISA 板 2 h，PBST 洗 3 遍；以 100 μL/孔的量加入本实验室验证保存的 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁样品和阴性乳汁样品（乳汁稀释 200 倍）于 37 ℃ 孵育 1 h，PBST 洗 3 次；加入 1 000 倍稀释的抗血清（100 μL/孔）于 37 ℃ 孵育 1 h，PBST 洗 3 次；加入 5 000

倍稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (100 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗 3 次; 加入 TMB (50 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 显色 8 min, 再加入终止液 (50 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 终止反应。利用酶标仪读取样品的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值。采用 HRP 标记的山羊抗猪 IgA 抗体检测 PEDV sIgA 抗体阳性 和 阴性 乳汁 作为 对照。将 PEDV sIgA 抗体 阳性 乳汁 样品 用 PBS 稀 释 20 倍, 取 30 μL 稀 释 后 的 乳 汁 样 品 并 加 入 蛋 白 Loading buffer 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 样 10 min 制 备 蛋 白 样 品, 凝 胶 电 泳 后 按 1.6 中 所 述 方 法 进 行 转 膜 和 封 闭, 2 000 倍 稀 释 的 抗 血 清 和 阴 性 兔 血 清 分 别 作 为 一 抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过 夜 孵 育, 5 000 倍 稀 释 的 HRP 标 记 的 山 羊 抗 兔 IgG 抗 体 于 室 温 孵 育 1 h, 最 后 添 加 ECL 进 行 曝 光 检 测。

2 结果

2.1 重组质粒 pET30a-J 的构建

用 特 异 性 引 物 经 PCR 扩 增 J 链 基 因, 核 酸 电 泳 可 见 477 bp 条 带, 符 合 预 期 大 小 (图 1A)。将 目 的 片 段 经 酶 切 连 接 后 转 化 至 DH5 α 感 受 态 细 胞 中, 在 LB 平 板 上 挑 取 单 个 菌 落, 增 菌 培 养 后 使 用 pET30a-His 载 体 通 用 引 物 对 菌 液 进 行 PCR 鉴 定, 核 酸 电 泳 可 见 预 期 条 带 (图 1B)。阳 性 质 粒 进 行 酶 切 鉴 定, pET30a 载 体 大 小 为 5 422 bp, 片 段 大 小 为 477 bp, 符 合 预 期 (图 1C)。将 PCR 阳 性 菌 液 送 由 擎 科 生 物 科 技 有 限 公 司 进 行 测 序 鉴 定, 经 序 列 比 对 与 参 考 序 列 完 全 一 致, 表 明 已 成 功 构 建 pET30a-J 重 组 质 粒。



M. DNA Marker; 1. J链基因的 PCR 产物; 2、5. 阴性对照; 3、4. 含 pET30a-J 重组质粒菌液的 PCR 鉴定; 6. pET30a 空载体对照; 7. pET30a-J 重组质粒的双酶切鉴定。

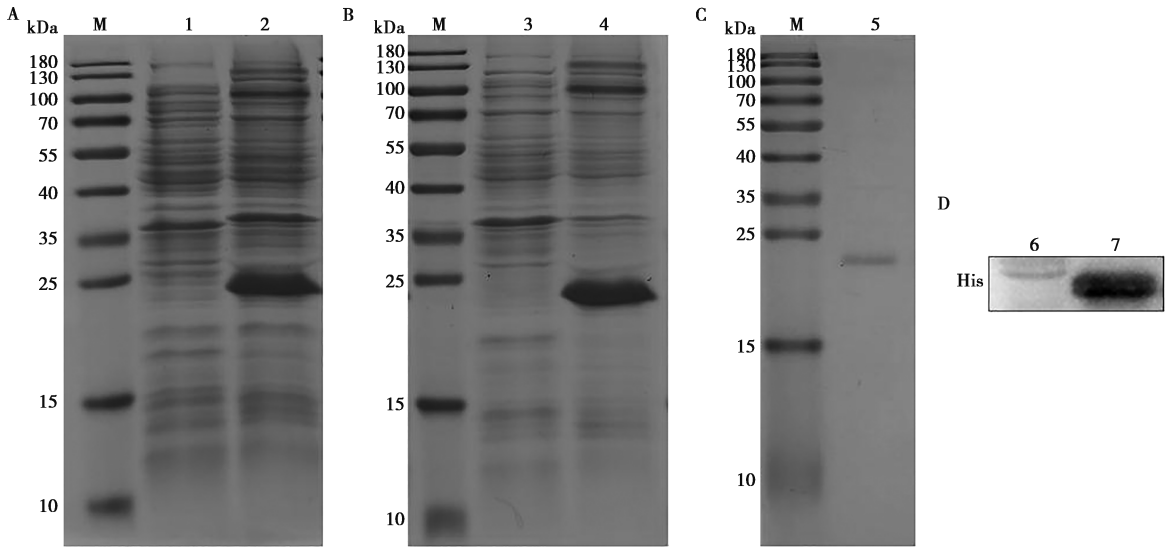
A. PCR 扩增 J 链基因; B. 阳性菌液 PCR 鉴定; C. 酶切鉴定。

图 1 重组质粒 pET30a-J 的构建

2.2 猪免疫球蛋白 J 链的原核表达

pET30a-J 在大肠杆菌中诱导表达 8 h 后, 制备诱导前和诱导后的蛋白样, SDS-PAGE 结果显示 J 链 (22 kDa) 在大肠杆菌中成功表达, 符合预期 (图 2A)。随后将诱导后的菌液进行超声破碎后制备上清液和沉淀蛋白样, 经 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达形式, 结果显示 J 链以包涵体形式表达 (图 2B)。将大肠杆菌表达的 J 链蛋白, 超声破碎后取沉淀, 用 3 mol/L

尿素在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下洗沉淀样品 2 次, 每次 8 h, 离心收集沉淀用 8 mol/L 尿素溶解包涵体, 利用尿素浓度逐级降低复性蛋白, 之后利用镍柱纯化蛋白, 用 300 mmol/L 咪唑进行洗脱, 经 SDS-PAGE 鉴定得到纯净的目的蛋白 (图 2C), 符合预期, 经 BCA 法测定纯化后的蛋白浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。Western blot 结果显示该蛋白可与 His 单抗特异性结合 (图 2D)。上述结果表明本研究成功表达并纯化出猪免疫球蛋白 J 链。



M. 蛋白质 Marker; 1、6. pET30a-J 未诱导; 2. pET30a-J 诱导后; 3. pET30a-J 裂解后上清液; 4. pET30a-J 裂解后沉淀; 5、7. 纯化后的 J 链。

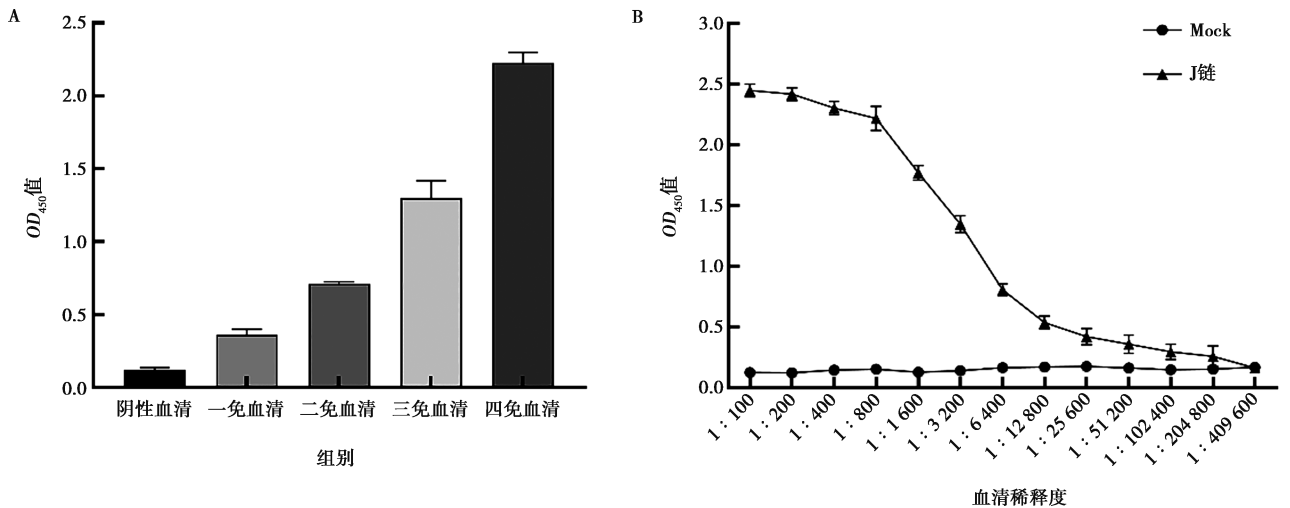
A. J 链的表达鉴定; B. J 链可溶性表达的鉴定; C. J 链蛋白的纯化; D. Western blot 鉴定 J 链纯化。

图 2 J 链的原核表达和纯化

2.3 猪免疫球蛋白 J 链抗血清的制备

ELISA 检测免疫前及各次免疫后血清中 J 链的抗体滴度, 结果显示随着免疫次数的增加, 血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值逐渐升高, 说明抗体的滴度随免疫次数增

加逐渐上升 (图 3A); 将四免后第 10 天采集的血清按不同的稀释比例进行 ELISA, 结果显示制备的抗血清稀释至 1 : 6 400 时仍具有良好的反应性 (图 3B)。



A. 抗 J 链抗体水平的检测; B. 抗 J 链抗体滴度的测定。

图 3 抗 J 链血清的制备

2.4 猪免疫球蛋白 J 链抗血清的反应性验证

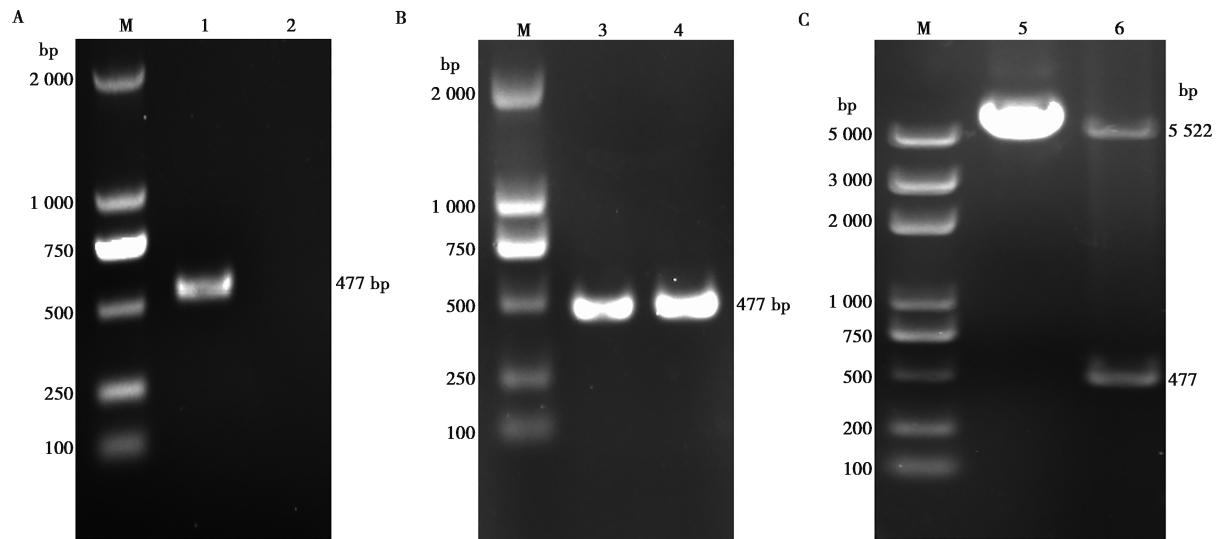
2.4.1 猪免疫球蛋白 J 链抗血清与真核细胞中 J 链的反应性验证

用特异性引物经 PCR 扩增 J 链基因, 核酸电泳可见符合预期大小的条带 (477 bp, 图 4A); 经酶切

连接法将 J 链基因克隆至 pcDNA3.1-His 载体, 使用 pcDNA3.1-His 载体通用引物经 PCR 鉴定有预期条带 (图 4B); 阳性质粒进行酶切鉴定, pcDNA3.1-His 载体大小为 5 522 bp, 片段大小为 477 bp, 符合预期 (图 4C); 测序证明克隆到 pcDNA3.1-His 载体中的

序列与参考序列完全一致，证明成功构建重组质粒 pcDNA3.1-J。将构建的重组质粒 pcDNA3.1-J 利用 PEI 转染 293T 细胞，转染 48 h 后收集细胞制备蛋白样，Western blot 鉴定结果显示有预期条带（图 5A）；

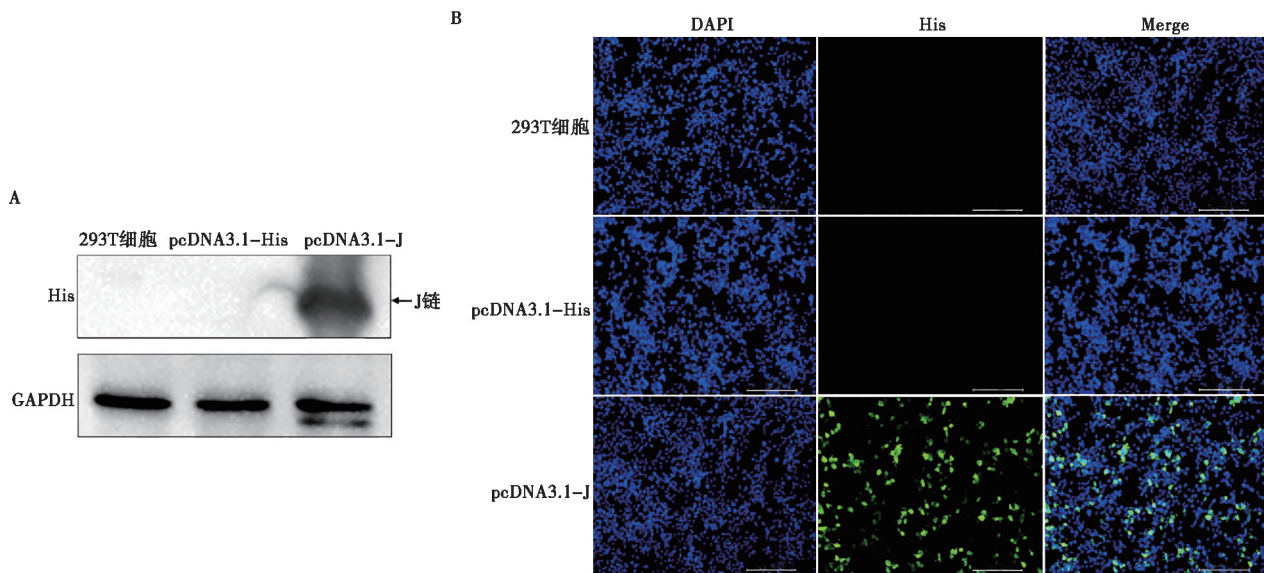
36 h 后进行 IFA 验证，置于荧光显微镜下观察到有特异性绿色荧光出现（图 5B），说明重组质粒 pcDNA3.1-J 在 293T 细胞中成功表达。



M. DNA Marker; 1. J 链基因的 PCR 产物; 2. 阴性对照; 3、4. 含 pcDNA3.1-J 重组质粒菌液的 PCR 鉴定; 5. pcDNA3.1 空载体对照; 6. pcDNA3.1-J 重组质粒的双酶切鉴定。

A. PCR 扩增 J 链基因; B. 阳性菌液 PCR 鉴定; C. 酶切鉴定。

图 4 重组质粒 pcDNA3.1-J 构建

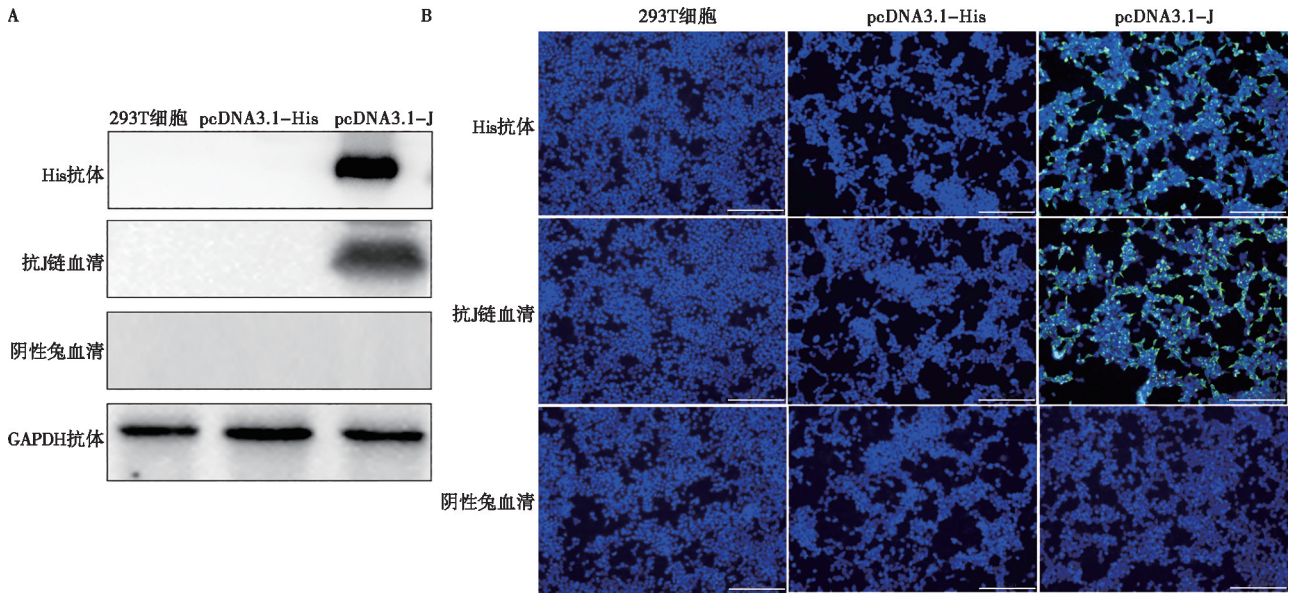


A. Western blot 鉴定 J 链在 293T 细胞中的表达; B. IFA 鉴定 J 链在 293T 细胞中的表达 (标尺=200 μm)。

图 5 J 链在 293T 细胞中的表达鉴定

将 pcDNA3.1-J 转染细胞，分别采用 Western blot 和 IFA 验证抗血清的反应性。Western blot 结果显示，所制备的抗血清可成功用于检测 J 链的表达（图 6A）；IFA 结果显示，His 抗体检测有特异性荧光，

说明转染的重组质粒 pcDNA3.1-J 在 293T 细胞中成功表达；制备的抗血清检测有特异性荧光，而阴性血清未见绿色荧光，说明所制备的抗血清可成功检出 293T 细胞内表达的 J 链（图 6B）。



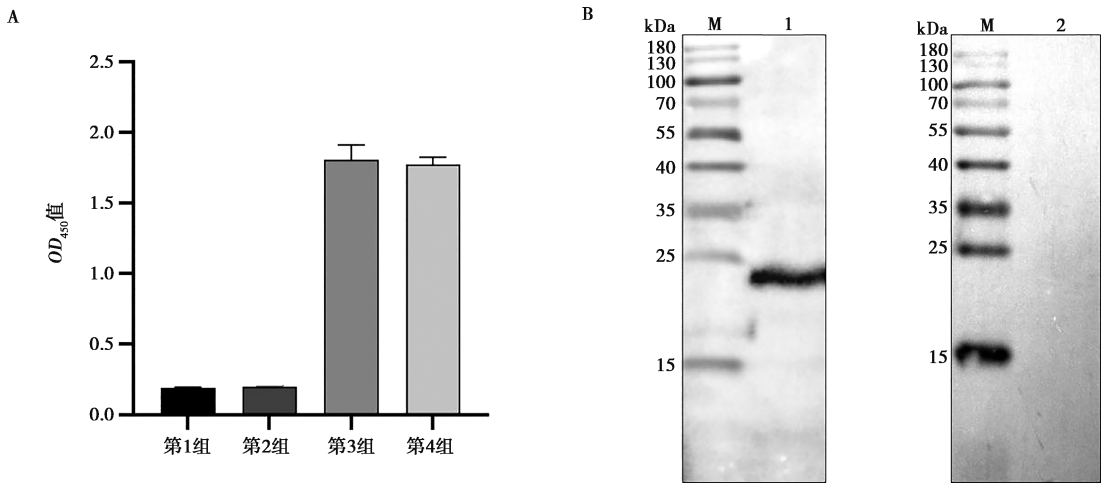
A. Western blot 验证抗血清与真核细胞中 J 链的反应性；B. IFA 验证抗血清与真核细胞中 J 链的反应性（标尺 = 200 μm）。

图 6 抗血清与真核细胞中 J 链的反应性验证

2.4.2 猪免疫球蛋白 J 链抗血清与猪乳中 J 链的反应性验证

ELISA 结果显示，制备的抗血清与 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁反应，说明所制备的抗血清可与猪乳中的

J 链结合（图 7A）；Western blot 结果显示抗血清可与猪乳中的 J 链特异性结合，目的条带大小与预期相符（图 7B）。



注：第 1 组为 HRP 标记的山羊抗猪 IgA 抗体检测 PEDV sIgA 抗体阴性乳汁；第 2 组为制备的抗血清检测 PEDV sIgA 抗体阴性乳汁；第 3 组为 HRP 标记的山羊抗猪 IgA 抗体检测 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁；第 4 组为制备的抗血清检测 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁；泳道 M 为蛋白质 Marker；泳道 1 为制备的抗血清检测 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁；泳道 2 为阴性兔血清检测 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁。

图 7 ELISA (A) 和 Western blot (B) 验证抗 J 链血清与猪乳中的 J 链反应性

3 讨论

在科学研究和生物医药领域，通过原核表达系统来表达目标蛋白已成为一种广泛应用的技术^[14]。与

真核表达系统相比，原核表达系统具有明确的遗传背景、短时间内高效生产大量蛋白质以及操作简便等优点。然而，在利用原核系统表达源自真核生物的蛋白过程中，往往会遇到一系列问题，比如：难以有效表

达含有大量稀有密码子的蛋白质，外源性蛋白质容易被原核生物胞质内的蛋白酶降解，外源蛋白质往往以不溶包涵体形式存在^[15]。本研究尝试使用原核表达系统制备 J 链，并在试验初期阶段探索了低温诱导、减少 IPTG 浓度、更换标签序列等多种策略以期获得可溶性产物，但试验结果显示 J 链仍以包涵体形式存在。造成这一现象的主要原因是 J 链结构中含有 3 个对维持其正确折叠及生物学功能至关重要的链内二硫键^[3]，但大肠杆菌内部环境不利于二硫键的生成，J 链无法形成固有结构，因此聚集在一起形成无活性的包涵体^[16]。为了解决 J 链不溶问题以便后续纯化过程，本研究采用 8 mol/L 尿素处理 J 链，经过变性复性后转变为可溶蛋白，SDS-PAGE 结果显示成功实现了 J 链的纯化，Western blot 结果显示纯化出的蛋白为目的蛋白。

本研究构建了 pcDNA3.1-J 真核表达载体，并将其转染至 293T 细胞中，分别利用 Western blot 和 IFA 试验验证制备的抗血清能与在真核细胞中表达的 J 链特异性结合，说明制备的抗血清具有良好的反应性。猪乳中含大量的 sIgA 和 sIgM 抗体^[17]，sIgA 和 sIgM 抗体的形成需要 J 链发挥聚合作用，为进一步验证抗血清与猪免疫球蛋白 J 链的反应性，本研究利用实验室收集验证的 PEDV sIgA 抗体阳性乳汁，采用 ELISA 和 Western blot 进行进一步验证，结果显示制备的抗血清可与乳汁中的 J 链反应，证明制备的抗血清具有良好的应用潜力。

免疫球蛋白 J 链是 sIgA 形成过程中所必需的一个分子，在黏膜免疫中发挥至关重要的作用。关于 J 链的免疫学功能尚未完全明确，仍需进行广泛而深入的研究解析其具体机制，抗体是研究蛋白功能的重要材料，本研究制备了猪免疫球蛋白 J 链的抗血清，为 J 链免疫学功能的探究提供了材料。

参考文献：

[1] MESTECKY J, ZIKAN J, BUTLER W T. Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chains [J]. *Science*, 1971, 171 (3976): 1163-1165.

[2] GIANNONE C, MESS X, HE R, et al. How J-chain ensures the

assembly of immunoglobulin IgM pentamers [J]. *EMBO J*, 2025, 44 (2): 505-533.

[3] KAWASAKI K, OHTA Y, CASTRO C D, et al. The immunoglobulin J chain is an evolutionarily co-opted chemokine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121 (3): e2318995121.

[4] JOHANSEN, BRAATHEN, BRANDTZAEG. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation [J]. *Scand J Immunol*, 2000, 52 (3): 240-248.

[5] MESTECKY J, SCHROHENLOHER R E. Site of attachment of J chain to human immunoglobulin M [J]. *Nature*, 1974, 249 (458): 650-652.

[6] MESTECKY J, SCHROHENLOHER R E, KULHAVY R, et al. Site of J chain attachment to human polymeric IgA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71 (2): 544-548.

[7] XIONG E, LI Y, MIN Q, et al. MZB1 promotes the secretion of J-chain-containing dimeric IgA and is critical for the suppression of gut inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116 (27): 13480-13489.

[8] WEI H, WANG J Y. Role of polymeric immunoglobulin receptor in IgA and IgM transcytosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (5): 2284.

[9] BEYER H, SOMMERFELD M, GRANDIEN K, et al. Functional studies with IgM and IgA immunoglobulins: binding to pIgR, Fc α μ R, Fc μ R, and CDC activities [J]. *APMIS*, 2024, 132 (4): 277-288.

[10] 刘建国, 赵玉洁. pIgR/sIgA 与口腔疾病 [J]. *口腔医学研究*, 2021, 37 (8): 677-681.

[11] LI Y, JIN L, CHEN T. The effects of secretory IgA in the mucosal immune system [J]. *BioMed Res Int*, 2020, 2020 (1): 2032057.

[12] KLIMOVICH V B, SAMOĽOVICH M P, KLIMOVICH B V. Problem of J-chain of immunoglobulins [J]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 2008, 44 (2): 131-143.

[13] CASTRO C D, FLAJNIK M F. Putting J chain back on the map: how might its expression define plasma cell development [J]. *J Immunol*, 2014, 193 (7): 3248-3255.

[14] 吴珊珊, 朱芸, 陈珊珊, 等. 融合标签在蛋白质可溶性表达中的应用进展 [J]. *化工进展*, 2014, 33 (4): 993-998.

[15] KESIDIS A, DEPPING P, LODÉ A, et al. Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts [J]. *Methods*, 2020, 180: 3-18.

[16] 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略 [J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43 (9): 33-45.

[17] 刘妍君. 大约克猪乳蛋白质: 初乳和常乳中的差异表达、遗传多态性和初步纯化 [D]. 成都: 西南民族大学, 2022.