

王利刚, 杜菁, 吴婕, 等. 高邮鸭整合素  $\alpha 8$  亚基蛋白多克隆抗体制备及应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 101-108.

WANG L G, DU J, WU J, et al. Preparation and application of polyclonal antibodies targeting the integrin alpha 8 subunit protein in Gaoyou ducks [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 101-108.

## 高邮鸭整合素 $\alpha 8$ 亚基蛋白多克隆抗体制备及应用

王利刚<sup>1</sup>, 杜菁<sup>1</sup>, 吴婕<sup>1</sup>, 田维婷<sup>1</sup>, 朱睿<sup>1,2</sup>, 杨子恒<sup>3</sup>, 贲诗琦<sup>3</sup>, 张蕾<sup>1\*</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

2. 江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室/江苏现代畜牧与新兽药工程技术中心, 江苏 泰州 225300;

3. 江苏省如皋中学, 江苏 南通 226500)

**摘要:** 旨在制备针对高邮鸭整合素  $\alpha 8$  亚基 (ITGA8) 蛋白的多克隆抗体, 以研究其在卵巢发育过程中的作用机制。通过生物信息学分析, 筛选 ITGA8 的高免疫原区域, 克隆高邮鸭 ITGA8 基因, 并在原核表达系统中成功表达与纯化 ITGA8 蛋白免疫原。利用该免疫原免疫新西兰白兔, 制备出效价达 1:102 400 的多克隆抗体。Western blot 和间接免疫荧光试验结果验证了该抗体的高特异性。综上, 本试验制备的 ITGA8 多克隆抗体具有良好的特异性和应用潜力, 为深入探讨 ITGA8 在高邮鸭卵巢发育中的作用机制提供了重要的试验工具。

**关键词:** 高邮鸭; 整合素  $\alpha 8$  亚基蛋白; 多克隆抗体

**中图分类号:** S834 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)10-0101-08

## Preparation and application of polyclonal antibodies targeting the integrin alpha 8 subunit protein in Gaoyou ducks

WANG Ligang<sup>1</sup>, DU Jing<sup>1</sup>, WU Jie<sup>1</sup>, TIAN Weiting<sup>1</sup>, ZHU Rui<sup>1,2</sup>,

YANG Ziheng<sup>3</sup>, BEN Shiqi<sup>3</sup>, ZHANG Lei<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals/Engineering Technology Research Center for Modern Animal Science and Novel Veterinary Pharmaceutic Development, Taizhou 225300, China;

3. Jiangsu Rugao Senior High School, Nantong 226500, China)

**Abstract:** This study aimed to produce polyclonal antibodies against the integrin alpha 8 subunit (ITGA8) protein in Gaoyou ducks to explore its role in ovarian development highly immunogenic regions of ITGA8 were identified by bioinformatic analysis. The ITGA8 gene of the Gaoyou ducks was then successfully cloned, expressed, and purified using a prokaryotic expression system. The purified immunogen was used to immunize New Zealand rabbits, resulting in polyclonal antibodies with a titer of 1:102 400. The Western blot and indirect immunofluorescence assays confirmed the high specificity of these antibodies. This study demonstrated that the prepared ITGA8 polyclonal antibodies exhibited strong specificity and promised potential applications as an important experimental tool for further research on the role of ITGA8 in ovarian development in Gaoyou ducks.

**Keywords:** Gaoyou duck; integrin alpha 8 subunit protein; polyclonal antibody

高邮鸭是我国著名的肉蛋兼用型地方麻鸭品种,

具有生长快、肉质优良和高产蛋的特点, 尤其以双黄蛋的高产率而闻名。高邮鸭蛋因其丰富的氨基酸和不饱和脂肪酸, 尤其富含对健康有益的花生四烯酸 (ARA) 和二十二碳六烯酸 (DHA), 展现出卓越的营养价值和独特风味, 已成为市场上的高端产品<sup>[1]</sup>。然而, 产蛋性能的表型差异限制了该品种的充分开发与利用。前期研究表明, 高产与低产高邮鸭在卵巢结构、卵泡发育、生殖激素水平以及相关基因和长链非编码 RNA 表达方面存在显著差异, 这些差异可能共

收稿日期: 2024-12-25; 修回日期: 2025-07-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32002157); 江苏省高校自然科学研究项目 (20KJD230001); 江苏农牧科技职业学院院级课题 (NSFPT202415); 2023年度江苏省教育厅“江苏高校‘青蓝工程’”项目 (苏教师函[2023] 27号); 江苏省高职院校青年教师企业实践项目 (2023)

第一作者: 王利刚, 男, 硕士, 副教授

\*通信作者: 张蕾, 博士, 副教授, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: leizhang@jsahvc.edu.cn。

同影响卵泡成熟与排卵过程,进而决定产蛋性能<sup>[2-5]</sup>。基于此,Zhang等<sup>[6]</sup>通过对高、低产高邮鸭卵巢组织的全转录组分析发现,PI3K-Akt信号通路可能与高邮鸭的卵巢功能密切相关,进而影响总产蛋量和双黄蛋的产量。

整合素(integrins,ITGs)作为PI3K-Akt信号通路的上游因子,由 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基组成的异二聚体跨膜蛋白包括至少18种 $\alpha$ 亚基和8种 $\beta$ 亚基。它们在细胞与细胞外基质之间的黏附和信号传导中起关键作用,调节细胞的黏附、迁移、增殖、分化等生物学过程<sup>[7-8]</sup>。整合素 $\alpha 8$ 亚基(integrin subunit alpha 8,ITGA8)作为一种关键的细胞黏附分子,在多个生物学过程中发挥重要作用,近年来受到广泛的关注。有研究表明,ITGA8通过减少成纤维细胞激活和免疫细胞浸润,减轻了慢性肾间质纤维化<sup>[9]</sup>;在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和转移调控中起重要作用<sup>[10-12]</sup>;同时它还对家禽的生长性能产生显著影响<sup>[13-15]</sup>。此外,Sun等<sup>[16]</sup>研究发现,ITGA8在高产与低产麻鸭卵巢组织中差异表达,通过调控肌动蛋白细胞骨架的形成,参与卵的生产调控,表明ITGA8在卵泡发育中发挥了重要作用。然而,迄今为止,关于ITGA8在卵泡发育调控中的分子机制尚未深入研究。因此,本研究从高邮鸭卵巢组织中克隆ITGA8基因,并利用原核表达系统重组表达ITGA8蛋白,制备特异性良好的兔多克隆抗体,为下一步探讨ITGA8在卵泡发育过程中的生物学功能提供重要的试验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

4~5周龄SPF级雄性新西兰白兔,购自邳州市东方养殖有限公司;240日龄高邮鸭母鸭由泰州丰达

农牧科技有限公司提供。

### 1.2 主要试剂

pCAGGS和pEGFP-N1质粒均由江苏省兽用生物制药高技术重点实验室保存;2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)、ClonExpress II One Step Cloning Kit和DL15000 DNA Marker均购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;BL21感受态、BCA蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG(H+L)、小鼠抗GAPDH抗体、HRP标记山羊抗小鼠IgG抗体、Anti-GFP Tag(HRP) Monoclonal Antibody和抗荧光淬灭封片液(含DAPI)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Alexa Fluor 555标记的山羊抗兔IgG(H+L)购自Thermo Fisher Scientific公司;Anti-His Tag(HRP) Monoclonal Antibody购自北京索莱宝科技有限公司;HisSep Ni-NTA MagBeads购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;兔多抗制备佐剂QuickAntibody-Rabbit8W购自苏州博奥龙科技有限公司;HB-PET自诱导培养基购自青岛高科园海博生物有限公司;转染试剂X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent购自Roche公司。

### 1.3 高邮鸭ITGA8基因克隆及重组表达载体构建

参考NCBI数据库ITGA8基因序列(GenBank:XM\_038174267.1)分别设计PCR特异性扩增引物(表1)。TRIzol法提取高邮鸭卵巢组织总RNA并反转录成cDNA,通过不同引物PCR扩增ITGA8基因,利用同源重组方法将PCR扩增的目的片段分别克隆至相应的真核表达载体中,经菌液PCR和质粒单酶切、双酶切鉴定正确后送苏州金唯智生物科技有限公司测序,测序正确的重组载体分别命名为pCAGGS-ITGA8和pEGFP-ITGA8。

表1 PCR扩增引物

引物名称	引物序列(5'→3')	酶切位点
P1	pCAGGS-ITGA8-F agctcctcgtcgtcgtaccATGCTGCGCCGCCGGCAG	<i>Kpn</i> I
	pCAGGS-ITGA8-R gggaaaaagatctcgtcgtcgtaccCTATGCATCAGTAGTCTTGTATTGTCAG TTG	<i>Xho</i> I
P2	pEGFP-ITGA8-F agcgtcaccggactcagatctcgtaccATGCTGCGCCGCCGGCAG	<i>Xho</i> I
	pEGFP-ITGA8-R ggatccggggccgcgggtaccgtTCATCAGTAGTCTTGTATTGTCAGTTG	<i>Kpn</i> I

注:小写字母表示同源臂序列,大写字母表示ITGA8基因序列,下划线表示酶切位点。

### 1.4 生物信息学分析

采用在线工具对高邮鸭ITGA8蛋白等电点、信号肽、跨膜结构和蛋白三维模型等进行生物信息学分

析(表2),通过DNASTAR软件进行蛋白亲水性和抗原性预测。

表2 生物信息学分析在线工具

在线工具	用途	网址
IPC protein	蛋白等电点分析	http://isoelectric.org/index.html
SignalP-5.0	信号肽预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/
TMHMM-2.0	蛋白跨膜结构预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
AlphaFold3	蛋白三维结构建模	https://alphafoldserver.com/
PSORT II Prediction	亚细胞定位预测	https://psort.hgc.jp/form2.html

### 1.5 ITGA8 蛋白原核表达、鉴定和纯化

根据 1.3 中 ITGA8 基因的测序结果, 推导其蛋白氨基酸序列, 将选定的 ITGA8 免疫原序列送至苏州泓迅生物科技股份有限公司进行大肠杆菌偏好性密码子优化、合成并提供 pET30a (+) -ITGA8 重组质粒。将重组质粒转化至 BL21 感受态, 在 HB-PET 自诱导培养基中培养至对数生长期后转 20 °C 继续诱导培养 20 h。收集超声破碎前全菌、破碎后上清液, 用含 8 mol/L 尿素的结合液重悬破碎后沉淀, 离心后收集上清液, SDS-PAGE 和 Western blot 检测上述各组分中 ITGA8 蛋白表达情况 (使用 HRP 标记的 Anti-His Tag 直标抗体进行鉴定)。根据 HisSep Ni-NTA Agarose Resin 使用说明书, 将沉淀重悬后的上清液与磁珠 4 °C 结合过夜; 用含 8 mol/L 尿素和 50 mmol/L 咪唑的洗涤液洗涤 3 次; 用含 8 mol/L 尿素和 200 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白; 梯度透析法去

除蛋白洗脱液中的咪唑和尿素, 经 0.22 μm 滤器过滤后利用 BCA 法测定蛋白浓度, 于 -70 °C 冻存备用。

### 1.6 ITGA8 蛋白多克隆抗体的制备

设置免疫组和生理盐水对照组, 每组 3 只新西兰白兔。将纯化后的 ITGA8 蛋白经生理盐水稀释至 500 μg/mL, 与 QuickAntibody-Rabbit 8W 佐剂进行 1 : 1 混匀, 以 200 μL/只剂量经肌肉注射进行初次免疫, 初免后第 21 天和第 42 天以相同免疫方式进行加强免疫; 第 14 天和第 35 天经耳缘静脉采血, 第 56 天经心脏采血, 分别收集血清并进行效价检测 (免疫流程图见图 1)。以生理盐水对照组的血清作为阴性对照。所有动物实验操作均严格遵守科学技术部发布的《实验动物饲养与使用指南》以及江苏农牧科技职业学院动物伦理委员会的管理规定 (批准号: jsahvc-2024-70)。

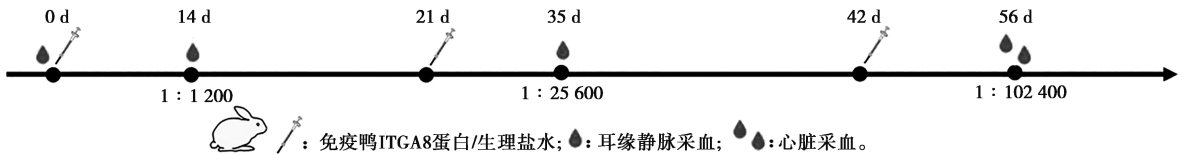


图1 免疫流程示意

### 1.7 间接 ELISA 测定抗体效价

将 ITGA8 蛋白调整至 2 μg/mL, 0.1 mL/孔, 4 °C 包被过夜, 3% 的脱脂乳 37 °C 封闭 2 h。将待检血清和阴性对照血清进行 2 倍倍比稀释, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 5 次后每孔加入 100 μL HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 5 000), 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 遍, TMB 室温显色 15 min, 终止显色后检测  $D_{450\text{nm}}$  值。以待测血清  $D_{450\text{nm}}$  值高于阴性对照血清  $D_{450\text{nm}}$  值 2.1 倍作为阳性血清的判定标准。每个样品均进行了 3 次独立的生物学重复, 利用 Graph-Pad Prism 9.5 绘图并计算“平均值±标准差”。

### 1.8 细胞转染

转染前 20~24 h 将生长状态良好的 COS-1 细胞接种于 12 孔板, 待细胞丰度约 80% 时, 按照 XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent 说明书操作

分别转染重组载体 pCAGGS - ITGA8 和 pEGFP - ITGA8, 同时设置 pCAGGS 和 pEGFP-N1 转染组作为阴性对照, 未转染的细胞作为空白对照。转染后 36 h 收集细胞蛋白, 同时用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min。

### 1.9 间接免疫荧光检测 (IFA)

4% 多聚甲醛固定后的细胞, 含 10% 胎牛血清的 PBS 4 °C 封闭过夜, 分别加入 1 : 500 比例稀释的 ITGA8 蛋白多克隆抗体 37 °C 孵育 2 h。以 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗 (1 : 1 000) 37 °C 孵育 1 h, DAPI 染色后置于荧光显微镜下观察。

### 1.10 Western blot 鉴定

将蛋白样品在 100 V 条件下进行 SDS-PAGE, 其中一块凝胶进行考马斯亮蓝染色, 检测细胞总蛋白的表达情况; 同时另一块凝胶在 400 mA 条件下转膜

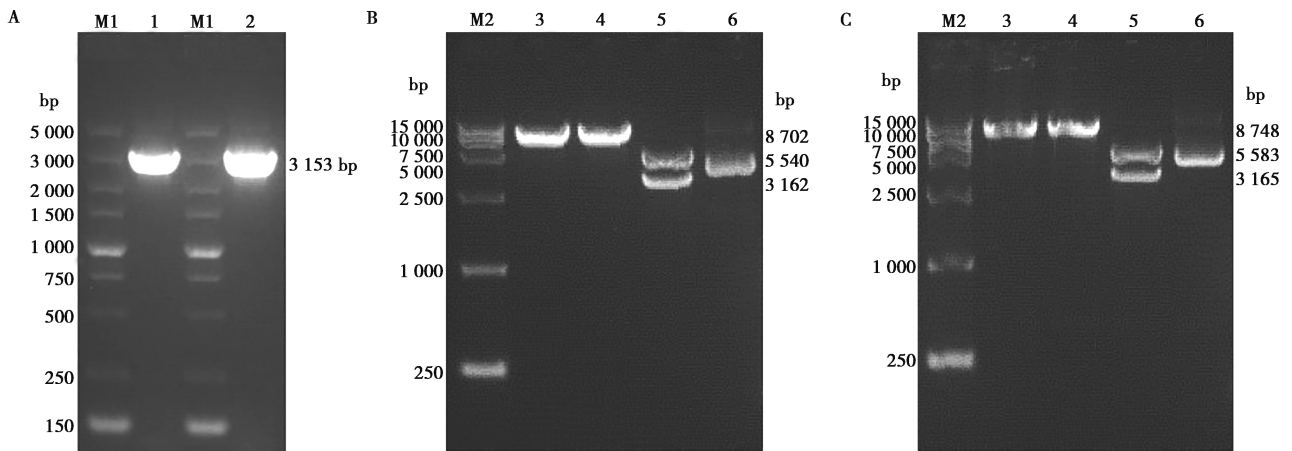
30 min, 将转印后的 NC 膜用 5% 脱脂乳室温封闭 2 h。以 ITGA8 蛋白多克隆抗体 (1 : 4 000) 和小鼠抗 GAPDH 抗体为一抗 (1 : 1 000), 室温孵育 1 h; 以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 利用 ECL 发光成像系统显色。使用 HRP 标记的标签抗体 (Anti-His Tag 和 Anti-GFP Tag 抗体) 进行 Western blot, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后直接进行 ECL 显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 高邮鸭 ITGA8 基因扩增及重组载体构建

以高邮鸭卵巢组织 cDNA 为模板, 分别使用 P1 和 P2 引物对进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳显示, P1 和 P2 引物对的 PCR 扩增均获得了约 3 153 bp 的

特异性片段 (图 2A), 结果与预期一致。通过同源重组方法, 将 PCR 扩增产物分别克隆到 pCAGGS 和 pEGFP 载体中。酶切结果显示, 重组载体 pEGFP-ITGA8 经 *Kpn* I 或 *Xho* I 单酶切后, 在 8 702 bp 处出现单一条带; 双酶切后, 在 5 540 和 3 162 bp 处分别出现线性化载体和目的片段, 符合预期 (图 2B)。重组载体 pCAGGS-ITGA8 经 *Xho* I 或 *Kpn* I 单酶切后, 在 8 748 bp 处观察到单一条带; 双酶切后, 在 5 583 和 3 165 bp 处分别观察到线性化载体和目的片段, 结果与预期一致 (图 2C)。测序结果显示, 所构建载体中的序列与 NCBI 数据库中公布的绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*) ITGA8 基因序列的相似性为 100%。以上结果表明, 重组载体 pEGFP-ITGA8 和 pCAGGS-ITGA8 已成功构建。



M1. DL5000 DNA Marker; 1. P1 引物对 PCR 扩增产物; 2. P2 引物对 PCR 扩增产物; M2. DL15000 DNA Marker; 3. *Kpn* I 单酶切鉴定; 4. *Xho* I 单酶切鉴定; 5. *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定; 6. 质粒。

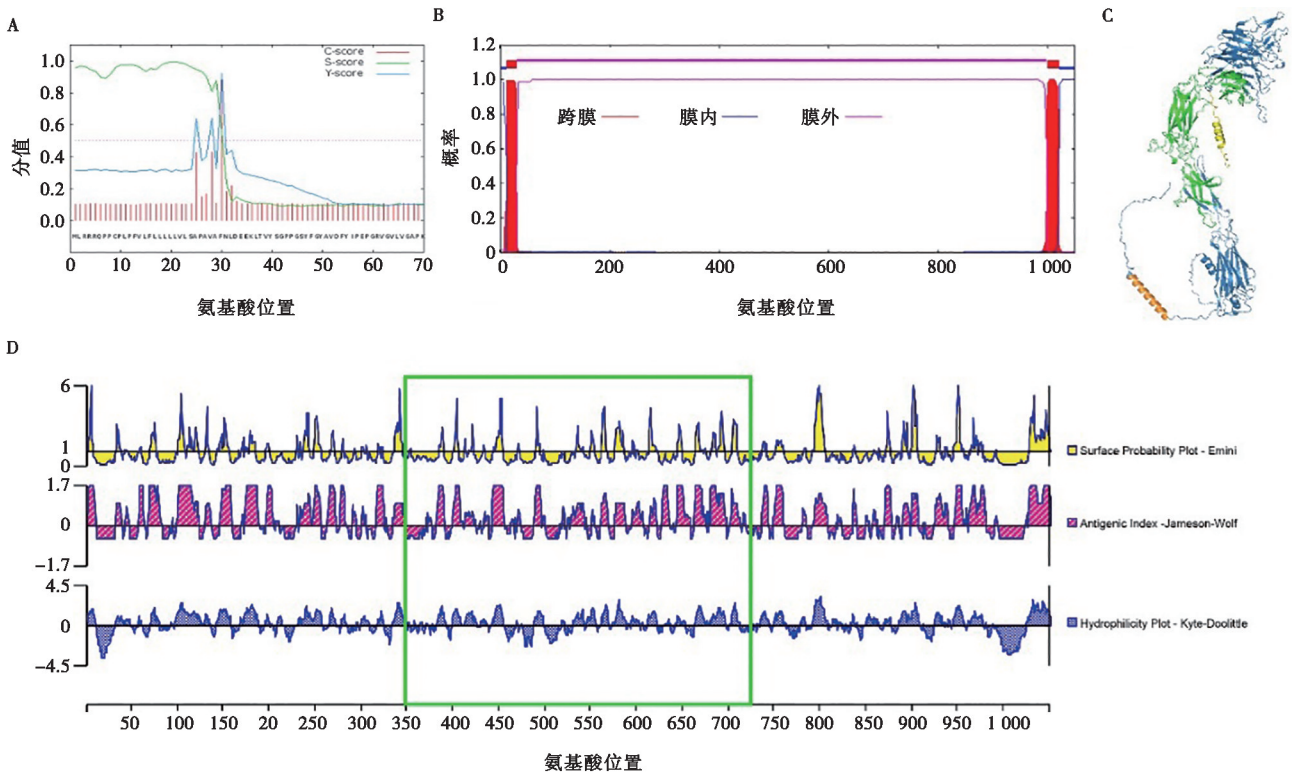
A. 高邮鸭 ITGA8 基因 PCR 扩增; B. pEGFP-ITGA8 质粒酶切鉴定; C. pCAGGS-ITGA8 酶切鉴定。

图 2 高邮鸭 ITGA8 基因扩增及重组载体构建

### 2.2 ITGA8 蛋白生物信息学分析

为了设计 ITGA8 蛋白的免疫原, 利用 IPC protein、SignalP-5.0 和 TMHMM-2.0 等生物信息学工具对 ITGA8 蛋白的等电点、信号肽和跨膜结构等进行预测。结果显示, ITGA8 蛋白分子质量为 116.8 kDa, 由 1 050 个氨基酸组成, 等电点为 5.37。信号肽位于 1~29 位氨基酸处 (图 3A), 跨膜结构域分别位于 13~30 位和 999~1 021 位氨基酸处 (图 3B)。亚细胞定位预测结果显示, 该蛋白可能定位于细胞质中, 其中内质网和高尔基体各占 33.3%, 线

粒体和细胞膜各占 11.1%; 蛋白三维结构模型显示, ITGA8 蛋白由多个  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠组成, 形成了复杂的三级结构, 包含多个结构域 (图 3C)。DNASTAR 软件分析结果显示, ITGA8 蛋白整体具有良好的抗原性和亲水性 (图 3D)。鉴于 ITGA8 蛋白的分子量较大且结构复杂, 选择了具有良好抗原性并包含一个完整结构域的氨基酸序列 (第 359~726 位氨基酸) (图 3C 绿色区域和图 3D 绿色框内序列) 进行后续的原核表达。该区域编码 368 个氨基酸, 分子质量为 40.8 kDa, 等电点为 4.64。



A. 信号肽结构预测; B. 跨膜结构预测; C. 蛋白三维结构模型预测 (黄色区域表示信号肽和跨膜结构重叠部分, 橙色区域表示跨膜结构, 绿色区域表示设计的 ITGA8 蛋白免疫原, 蓝色区域表示 ITGA8 蛋白其他部分); D. 蛋白抗原性和亲水性预测 (绿色框内的序列表示设计的 ITGA8 蛋白免疫原序列)。

图 3 ITGA8 蛋白生物信息学分析

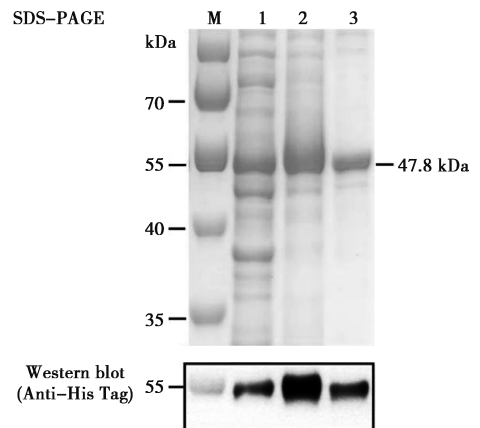
### 2.3 ITGA8 免疫原的表达、纯化及鉴定

为了获得 ITGA8 免疫原, 将 ITGA8 蛋白第 359~726 位氨基酸的基因序列进行密码子优化后构建 pET30a (+) - ITGA8 原核表达载体, 并 BL21 (DE3) 菌株中进行蛋白表达。SDS-PAGE 检测结果 (图 4), 破碎菌体的沉淀经 8 mol/L 尿素变性重悬的上清液样品中观察到 1 条约 48 kDa 的显著条带, 与重组 ITGA8 蛋白的理论分子量 (47.8 kDa) 相符。这表明 ITGA8 蛋白在 BL21 (DE3) 中主要以不溶性包涵体形式表达, 且经尿素变性处理后能够有效溶解。沉淀重悬后的上清液经 Ni-NTA 磁珠亲和后, 获得了较高纯度的目的蛋白; 纯化后的蛋白经透析复性, 最终获得可溶性 ITGA8 免疫原蛋白。Western blot 分析显示, SDS-PAGE 中的目的蛋白条带能被抗 His 标签抗体特异性识别, 表明成功制备了重组 ITGA8 蛋白免疫原。

### 2.4 ITGA8 多克隆抗体效价检测

以 ITGA8 蛋白免疫原作为底物, 采用间接 ELISA 方法检测免疫后不同时间点的多克隆抗体效价。结果显示 (图 5), 首次免疫后 2 周, ITGA8 多克隆抗体的效价约为 1:1 200 (起始稀释比为 1:300); 在加强免疫后 2 周 (首次免疫后第 35 天), 抗体效价显

著提高至 1:25 600 (起始稀释比为 1:400); 再次加强免疫后 2 周 (首次免疫后第 56 天), 抗体效价进一步升至 1:102 400 (起始稀释比为 1:800)。这些结果表明, 加强免疫有效提高了抗体效价, 且三免后具有良好的效价, 具备作为工具抗体的潜力, 并可用于后续试验。



M. 蛋白质分子量标准; 1. 破碎菌体的沉淀; 2. 纯化后的 ITGA8 蛋白; 3. 透析复性后的 ITGA8 蛋白。

图 4 ITGA8 免疫原的表达、纯化及鉴定

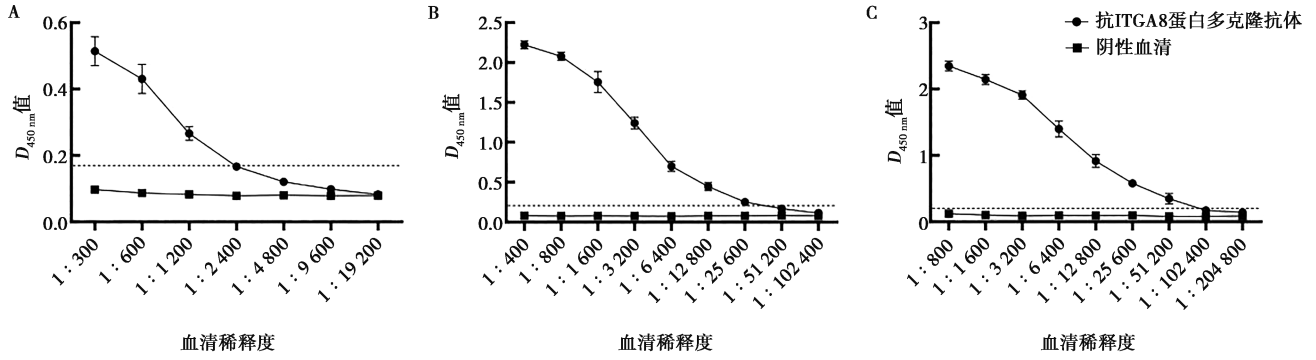
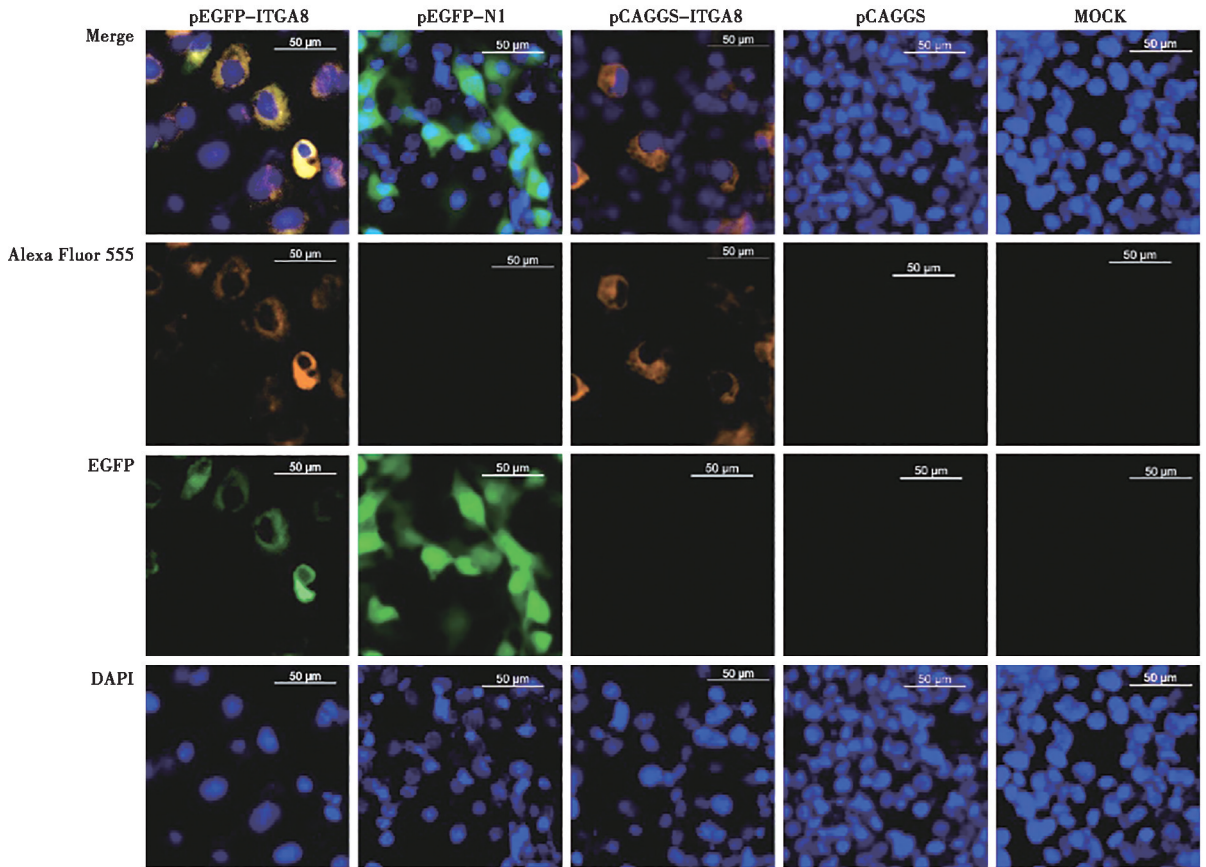


图 5 ITGA8 蛋白多克隆抗体分别在首免 (A)、二免 (B) 和三免 (C) 后 2 周的效价检测

### 2.5 IFA 检测 ITGA8 蛋白多克隆抗体特异性

通过利用 ITGA8 蛋白多克隆抗体标记 COS-1 细胞中外源表达的 ITGA8 蛋白以及 ITGA8-GFP 融合蛋白, 并通过荧光显微镜观察蛋白的表达情况, 以评估 ITGA8 多克隆抗体的特异性。结果显示, pCAGGS-ITGA8 转染组在细胞质中呈现出明显的橙色荧光, 而 pCAGGS 空载体转染组和 MOCK 对照组均未观察到橙色荧光信号。此外, pEGFP-N1 转染组观察到绿色荧

光均匀分布在整個细胞中, 而 pEGFP-ITGA8 转染组的绿色荧光则仅限于细胞质中, 且 GFP 蛋白的绿色荧光与 ITGA8 蛋白的橙色荧光几乎完全重叠 (图 6)。这些结果表明, 所制备的 ITGA8 蛋白多克隆抗体具有良好的特异性, 可应用于 IFA 检测, 同时证实了 ITGA8 蛋白和 ITGA8-GFP 融合蛋白的表达定位于细胞膜上。

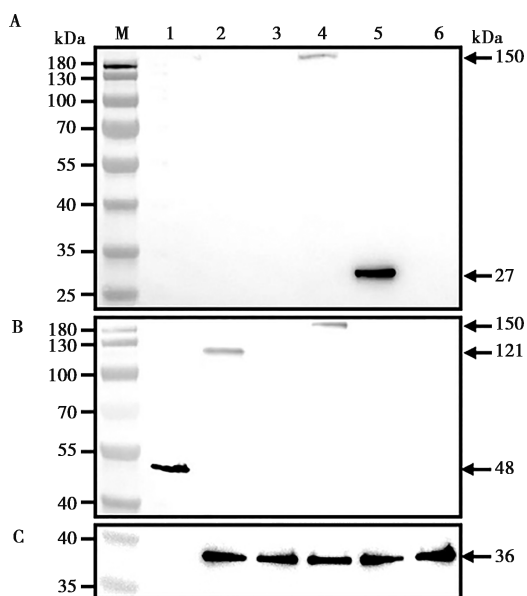


注: 橙色荧光表示 ITGA8 蛋白, 绿色荧光表示 GFP 蛋白, 蓝色荧光表示细胞核。

图 6 IFA 检测 ITGA8 蛋白多克隆抗体特异性 (标尺 = 50 μm)

## 2.6 ITGA8 蛋白多克隆抗体 Western blot 检测

通过 Western blot 试验, 利用 ITGA8 多克隆抗体检测 COS-1 细胞中外源表达的 ITGA8 蛋白及 ITGA8-GFP 融合蛋白, 以评估其特异性, 并以前期制备的 ITGA8 免疫原作为阳性对照。结果显示, GFP 抗体分别在 150 kDa 和 27 kDa 处特异性标记了 pEGFP-ITGA8 转染组中 ITGA8-GFP 融合蛋白和 pEGFP-N1 转染组中 GFP 蛋白 (图 7A)。ITGA8 多克隆抗体在 48、121 和 150 kDa 处特异性标记了 ITGA8 免疫原组、pCAGGS-ITGA8 转染组和 pEGFP-ITGA8 转染组中的 ITGA8 蛋白 (图 7B)。同时, GAPDH 抗体在 36 kDa 处特异性标记了 COS-1 细胞中的 GAPDH 蛋白 (图 7C)。结果表明, ITGA8 多克隆抗体具有良好的特异性, 可用于 Western blot 检测。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. ITGA8 免疫原; 2. pCAGGS-ITGA8 转染组细胞总蛋白样品; 3. pCAGGS 转染组细胞总蛋白样品; 4. pEGFP-ITGA8 转染组细胞总蛋白样品; 5. pEGFP-N1 转染组细胞总蛋白样品; 6. 未转染的 COS-1 细胞总蛋白样品。

A. 小鼠抗 GFP 抗体 (HRP 标记); B. ITGA8 多克隆抗体; C. 小鼠抗 GAPDH 蛋白抗体。

图 7 Western blot 检测 ITGA8 蛋白多克隆抗体特异性

## 3 讨论

ITGA8 可能在卵巢发育过程中通过调控卵泡成熟、细胞外基质的相互作用及信号传导发挥重要的生理作用<sup>[16]</sup>。深入研究 ITGA8 蛋白的分子调控机制, 离不开优质工具抗体的支持。本研究成功克隆了高邮鸭 ITGA8 基因, 利用原核表达系统重组表达 ITGA8 蛋白, 并制备了多克隆抗体。该抗体在 ELISA 检测中效价达到 1 : 102 400, 且在 IFA 和 Western blot 试

验中展现了良好的特异性。此抗体为进一步研究 ITGA8 在高邮鸭卵巢发育及繁殖性能中的分子机制提供了关键的试验工具。

利用生物信息学手段预测并针对性优化免疫原以增强免疫效果的策略在抗体制备研究中被广泛应用<sup>[17-19]</sup>。本研究中, ITGA8 蛋白由 1 050 个氨基酸组成, 分子质量为 116.79 kDa, 结构较复杂, 包含信号肽、跨膜结构以及多个功能结构域。本研究基于 ITGA8 蛋白的氨基酸序列, 通过生物信息学分析预测其亲水性、抗原性、跨膜结构和信号肽特征, 选择了第 359~726 位氨基酸序列作为免疫原, 以避免全长蛋白分子量过大、结构复杂引起的免疫难度<sup>[20]</sup>。免疫效果监测结果表明, 选取的部分 ITGA8 蛋白具有良好的免疫原性, 成功获得了理想的抗体效价。

ITGA8 蛋白的亚细胞定位结果显示, ITGA8 蛋白和 ITGA8-GFP 融合蛋白均主要定位于细胞质。然而, 这与 ITGA8 作为跨膜蛋白的功能并不一致。推测该现象可能与 ITGA8 的异源表达有关。研究表明, 跨膜蛋白的正确折叠和亚细胞定位通常依赖宿主细胞的内源性伴侣蛋白及折叠机制<sup>[21-23]</sup>。由于 COS-1 细胞来源于猴, 而 ITGA8 蛋白来源于高邮鸭, 所以可能在 COS-1 细胞中无法获得足够的分子伴侣支持, 或者未能正确折叠、修饰和转运, 导致其定位异常于细胞质。该推测符合 ITGA8 蛋白亚细胞定位于内质网、高尔基体、线粒体和细胞膜的生物信息学预测结果。

本研究中, 在转染 COS-1 细胞后, pEGFP-ITGA8 和 pCAGGS-ITGA8 质粒的表达水平较低, ITGA8-GFP 融合蛋白和 ITGA8 蛋白的表达水平显著低于 pEGFP-N1 质粒转染后 GFP 蛋白。鸭源跨膜蛋白 ITGA8 及其融合蛋白 ITGA8-GFP 在 COS-1 细胞中的低表达可能源于其较大的分子量 (约 150 kDa) 和复杂的跨膜结构, 导致折叠效率低, 容易被蛋白酶降解, 同时翻译后修饰可能不充分或发生错误<sup>[24-25]</sup>。此外, 异源表达系统中可能缺乏适当的分子伴侣, 进一步加剧了蛋白质的错误折叠和降解<sup>[26]</sup>。相比之下, GFP 蛋白由于其结构简单、折叠效率高, 且对翻译后修饰的依赖性较低, 因而在 COS-1 细胞中的表达水平显著高于 ITGA8 及其融合蛋白。

综上, 本研究成功制备了针对高邮鸭 ITGA8 蛋白的多克隆抗体, ELISA 检测效价达 1 : 102 400, Western blot 和 IFA 试验均验证了其良好的特异性。本研究结果为深入探讨 ITGA8 蛋白在高邮鸭卵巢发育中的功能提供了关键试验工具, 并为进一步研究高邮鸭繁殖性能的遗传改良奠定了坚实基础。

## 参考文献:

- [1] 陈梦颖, 龚兰, 何涛, 等. 高邮鸭蛋特征品质指标分析 [J]. 食品科学, 2024, 45 (2): 240-247.
- [2] 唐现文, 张蕾, 章敬旗, 等. 高邮鸭卵巢中双黄蛋性状相关 lncRNA 表达差异分析 [J]. 甘肃农业大学学报, 2021, 56 (2): 40-49, 60.
- [3] 张蕾, 张海波, 章敬旗, 等. 基于 RNA-Seq 测序的高、低产双黄蛋高邮鸭卵巢组织 SNP 筛选分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46 (12): 3495-3503.
- [4] 张蕾, 张响英, 章敬旗, 等. 高、低产双黄蛋高邮鸭卵巢组织差异分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (7): 1905-1911.
- [5] 张蕾, 张响英, 章敬旗, 等. 高、低产双黄蛋高邮鸭卵巢结构及生殖激素和相关基因差异 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34 (2): 385-389.
- [6] ZHANG L, ZHU R, SUN G, et al. Whole-transcriptome sequencing of ovary reveals the CeRNA regulation network in egg production of Gaoyou duck [J]. Genes (Basel), 2023, 15 (1): 9.
- [7] YANG X, CHITALIA S V, MATSUURA S, et al. Integrins and their role in megakaryocyte development and function [J]. Exp Hematol, 2022, 106: 31-39.
- [8] MRUGACZ M, BRYL A, FALKOWSKI M, et al. Integrins: an important link between angiogenesis, inflammation and eye diseases [J]. Cells, 2021, 10 (7): 1703.
- [9] MAREK I, LICHTNEGER T, CORDASIC N, et al. Alpha8 integrin (Itga8) signalling attenuates chronic renal interstitial fibrosis by reducing fibroblast activation, not by interfering with regulation of cell turnover [J]. PLoS One, 2016, 11 (3): e0150471.
- [10] RAN X M, YANG J, WANG Z Y, et al. M2 macrophage-derived exosomal circTMCO<sub>3</sub> acts through miR-515-5p and ITGA8 to enhance malignancy in ovarian cancer [J]. Commun Biol, 2024, 7 (1): 583.
- [11] RYU J, KOH Y, PARK H, et al. Highly expressed integrin- $\alpha$ 8 induces epithelial to mesenchymal transition-like features in multiple myeloma with early relapse [J]. Mol Cells, 2016, 39 (12): 898-908.
- [12] GONG Y Z, RUAN G T, LIAO X W, et al. Diagnostic and prognostic values of integrin  $\alpha$  subfamily mRNA expression in colon adenocarcinoma [J]. Oncol Rep, 2019, 42 (3): 923-936.
- [13] PEZESHKIAN Z, MIRHOSEINI S Z, GHOVATI S. Identification of hub genes involved in apparent metabolizable energy of chickens [J]. Anim Biotechnol, 2022, 33 (2): 242-249.
- [14] LIN R, LI H, LIN W, et al. Whole-genome selection signature differences between Chaohu and Ji'an red ducks [J]. BMC Genomics, 2024, 25 (1): 522.
- [15] HUANG R, CHEN J, DONG X, et al. Transcriptome data revealed the circRNA-miRNA-mRNA regulatory network during the proliferation and differentiation of myoblasts in Shitou goose [J]. Animals (Basel), 2024, 14 (4): 576.
- [16] SUN Y, WU Q, PAN J, et al. Identification of differentially expressed genes and signalling pathways in the ovary of higher and lower laying ducks [J]. Br Poult Sci, 2020, 61 (6): 609-614.
- [17] 王子仪, 金子安, 卢辰赫, 等. 猫冠状病毒非结构蛋白 3 的多克隆抗体制备及亚细胞定位 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2023, 49 (5): 744-754.
- [18] 李德龙, 周建方, 余远迪, 等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白和 M 蛋白截短表达及多克隆抗体制备 [J]. 动物医学进展, 2024, 45 (8): 41-44.
- [19] 王雯, 佟贺, 杨兴森, 等. 鹅星状病毒 2 型单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定 [J]. 南京农业大学学报, 2025, 48 (2): 401-409.
- [20] PEDROZA - ESCOBAR D, CASTILLO - MALDONADO I, GONZÁLEZ-CORTÉS T, et al. Molecular bases of protein antigenicity and determinants of immunogenicity, anergy, and mitogenicity [J]. Protein Pept Lett, 2023, 30 (9): 719-733.
- [21] HENDRICK J P, LANGER T, DAVIS T A, et al. Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90 (21): 10216-10220.
- [22] NAYLOR D J, HARTL F U. Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells [J]. Biochem Soc Symp, 2001 (68): 45-68.
- [23] YOUNG J C, BARRAL J M, ULRICH HARTL F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones [J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28 (10): 541-547.
- [24] CUNNINGHAM F, DEBER C M. Optimizing synthesis and expression of transmembrane peptides and proteins [J]. Methods, 2007, 41 (4): 370-380.
- [25] CLAES K, VANDEWALLE K, LAUKENS B, et al. Modular integrated secretory system engineering in *Pichia pastoris* to enhance G-protein coupled receptor expression [J]. ACS Synth Biol, 2016, 5 (10): 1070-1075.
- [26] WU X, RAPOPORT T A. Mechanistic insights into ER-associated protein degradation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2018, 53: 22-28.