

何惠, 付钰广, 李宝玉, 等. 猪滤泡辅助性 T 细胞转录因子 BCL6 抗血清的制备及功能验证 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 46-53.

HE H, FU Y G, LI B Y, et al. Preparation and functional verification of antiserum against transcription factor BCL6 of porcine follicular helper T cell [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 46-53.

## 猪滤泡辅助性 T 细胞转录因子 BCL6 抗血清的制备及功能验证

何惠<sup>1,2</sup>, 付钰广<sup>2</sup>, 李宝玉<sup>2</sup>, 刘光亮<sup>1,2\*</sup>

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

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)

**摘要:** 旨在制备猪滤泡辅助性 T (T<sub>fh</sub>) 细胞转录因子 B 细胞淋巴瘤 6 (BCL6) 抗血清。根据 GenBank 中猪 BCL6 开放阅读框, 优化设计并合成 pET30a-BCL6 和 pcDNA3.1-BCL6 重组表达载体, 将重组载体 pET30a-BCL6 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 加入 IPTG 诱导表达 BCL6 蛋白, 将纯化的目的蛋白与 206 佐剂混合乳化后经背部皮下免疫 BALB/c 小鼠, 经过 4 次免疫后收集获得抗血清。采用 ELISA 检测血清抗体滴度, 结果显示抗体水平随着免疫次数的增加而逐步升高, 抗血清稀释至 1:16 000 倍仍能与原核表达的 BCL6 蛋白反应; 采用 Western blot 评价抗血清与原核表达 BCL6 蛋白的反应性, 分析结果显示制备的抗血清可与原核表达 BCL6 蛋白特异性结合。为进一步验证抗血清与 BCL6 蛋白的反应性, 将重组载体 pcDNA3.1-BCL6 转染 HEK-293T 细胞, 采用 Western blot 评价抗血清的反应性, 结果显示所制备的抗血清可与真核表达的 BCL6 蛋白特异性结合; 采用间接免疫荧光 (IFA) 评价抗血清的反应性, IFA 结果与 Western blot 结果一致, 显示所制备的抗血清可与真核表达的 BCL6 蛋白特异性结合。综上, 本研究成功制备了猪 BCL6 抗血清, 为后期制备猪 BCL6 单克隆抗体及研究黏膜免疫过程中 T<sub>fh</sub> 细胞的相关功能奠定了基础。

**关键词:** 猪; 滤泡辅助性 T 细胞; 转录因子 BCL6; 抗血清

**中图分类号:** S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)11-0046-08

## Preparation and functional verification of antiserum against transcription factor BCL6 of porcine follicular helper T cell

HE Hui<sup>1,2</sup>, FU Yuguang<sup>2</sup>, LI Baoyu<sup>2</sup>, LIU Guangliang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** This study was to prepare porcine follicular helper T (T<sub>fh</sub>) cell transcription factor BCL6 antiserum for in-depth investigation of the biological functions of porcine T<sub>fh</sub> cells. Recombinant plasmids pET30a-BCL6 and pcDNA3.1-BCL6 were synthesized according to the porcine BCL6 gene deposited in GenBank. The plasmid pET30a-BCL6 was transformed into BL21 (DE3) competent cells, and was induced by IPTG to express BCL6 proteins in *E. coli*. The purified BCL6 proteins were mixed and emulsified with 206 adjuvant to immunize BALB/c mice subcutaneously. After four booster immunizations, ELISA was employed to assess serum antibody titers. The results demonstrated a progressive increase at antibody levels with successive immunizations, with antiserum retaining reactivity against prokaryotically expressed BCL6 proteins even at a 1:16 000 dilution. The Western blot analysis confirmed the specific binding of the prepared antiserum to prokaryotically expressed BCL6 proteins. To further validate the antiserum reactivity against BCL6 proteins, HEK-293T cells were transfected with the recombinant plasmid pcDNA3.1-BCL6. The subsequent Western blot analysis revealed specific binding of the antiserum to the eukaryotically expressed BCL6 proteins. The indirect immunofluorescence (IFA) results corroborated the Western blot findings, suggesting specific recognition of the eukaryotically expressed BCL6 protein in the HEK-293T cells by the antiserum. In summary, this study successfully generated an antiserum against BCL6 proteins of porcine T<sub>fh</sub> cell, and provided a basis for preparation of monoclonal antibodies against BCL6 proteins, and for related immunologic research.

**Keywords:** porcine; follicular helper T cell; transcription factor BCL6; antiserum

收稿日期: 2024-12-31; 修回日期: 2025-08-14

基金项目: 国家自然科学基金区域联合项目重点项目 (U22A20522); 甘肃省科技计划联合科研基金重点项目 (24JRRA811)

第一作者: 何惠, 女, 硕士

\* 通信作者: 刘光亮, 研究员, 研究方向为动物疫苗开发及分子免疫学, E-mail: 103050694@qq.com.

滤泡辅助性 T (T<sub>fh</sub>) 细胞于 2000 年首次在人类扁桃腺中被发现,其特征为高表达趋化因子受体 5 (CXCR5) 分子<sup>[1-3]</sup>,是区别于辅助性 T 细胞 1 型 (Th1)、辅助性 T 细胞 2 型 (Th2)、辅助性 T 细胞 17 型 (Th17) 及调节性 T 细胞 (Treg) 的另一亚群 CD4<sup>+</sup> T 细胞<sup>[4-6]</sup>。T<sub>fh</sub> 细胞主要分布于机体的淋巴组织中,对免疫应答具有调节作用,并在生发中心 (GC) 形成、B 细胞活化和抗体型别转换中发挥着至关重要的作用。转录因子 B 细胞淋巴瘤 6 (BCL6) 是 T<sub>fh</sub> 细胞分化的关键调控因子, BCL6 分子缺失后,机体不发生 T<sub>fh</sub> 细胞的分化,而其他 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群的分化不易受其影响<sup>[7-9]</sup>。BCL6 蛋白由 706 个氨基酸组成,属于 BTB-POZ 结构域 (BTB-POZ) 转录因子家族,是一种含锌指结构的序列特异性转录共抑制因子。BCL6 蛋白 N 端具有 BTB/POZ, BCL6 可通过该结构域招募其他转录共抑制因子,或与其他锌指结构蛋白相互作用,然后结合特异性 DNA 序列,发挥转录抑制作用。同时也有研究表明,转录因子 BCL6 对于 GC B 细胞和 T<sub>fh</sub> 的成熟和发育起调控作用<sup>[10-11]</sup>。在 T<sub>fh</sub> 细胞相关免疫反应发生的整个过程中,转录因子 BCL6 都受到严格的调控,参与这种调控的信号包括细胞因子、介导细胞间直接相互作用的表面共刺激分子以及细胞内其他转录因子<sup>[9,12]</sup>。

T<sub>fh</sub> 细胞的分化是一个多步骤且精细的过程<sup>[13-15]</sup>。初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞在树突状细胞及特定的细胞因子作用下增殖分化,上调表达转录因子 BCL6 并诱导其向 T<sub>fh</sub> 细胞分化<sup>[16]</sup>。上调表达的转录因子 BCL6 抑制 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1 (Blimp1) 分子的表达从而抑制初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞向非 T<sub>fh</sub> 细胞分化<sup>[17]</sup>。随着 T<sub>fh</sub> 细胞的起始分化,膜表面分子 CXCR5 上调表达,在其作用下初始分化的 T<sub>fh</sub> 细胞迁移至 B 细胞和 T 细胞交界区域,在 B 细胞的作用下介导 T<sub>fh</sub> 细胞进入 B 细胞淋巴滤泡,最终促进 T<sub>fh</sub> 细胞的完全成熟<sup>[16,18]</sup>。成熟的 T<sub>fh</sub> 细胞辅助 B 细胞成熟并分化为浆母细胞。

BCL6 作为 T<sub>fh</sub> 细胞分化的关键调节因子,与 T 细胞因子 1 (TCF1) 等转录因子共同抑制 Blimp1 的表达,对 T<sub>fh</sub> 细胞的成熟至关重要<sup>[19-21]</sup>。研究表明,人类和小鼠的 GC-T<sub>fh</sub> 细胞在表面蛋白标记、基因表达和 BCL6 表达上具有相似性,暗示出 T<sub>fh</sub> 细胞生物学特性的进化保守性。目前, T<sub>fh</sub> 细胞分化和功能研究主要集中在人类和小鼠,而关于猪 T<sub>fh</sub> 细胞的分化及生物学功能研究鲜见报道,其分化过程中涉及的细胞因子及机制尚不清楚,需要进一步深入研究。鉴于 BCL6 作为 T<sub>fh</sub> 细胞分化的标志性转录因子,开发针对性的抗体对于探索猪 T<sub>fh</sub> 细胞的分化和功能至关

重要。

基于此,本研究成功制备了猪源 T<sub>fh</sub> 细胞关键转录因子 BCL6 的抗血清,并对其功能进行了验证,为深入研究猪 T<sub>fh</sub> 细胞的分化和生物学功能提供物质材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞皆由本实验室制备保存。重组载体 pET-30a-BCL6 和 pcDNA3.1-BCL6 由擎科生物技术有限公司合成。2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 试剂购自诺唯赞公司; DNA Marker、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; IPTG 购自 SIGMA 公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I、*Eco*R I 和 *Xba* I 购自 Thermo Fisher 公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体购自中杉金桥生物技术有限公司; CoraLite<sup>®</sup> 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Thermo Fisher 公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Biofrox 公司; TMB 底物显色液购自 Surmodics 公司; Ni-NTA 蛋白纯化试剂购自 GE 公司; 二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒 (BCA) 购自碧云天公司。PCR 反应仪购自美国 Bio-Rad 公司; VARIO-SKAN LUX 多功能酶标仪购自赛默飞公司; Chemi-Doc<sup>™</sup> XRS+ 型高分辨率图像采集系统购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 (购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心) 严格按照《中华人民共和国动物伦理程序和指导原则》进行饲养与处理,且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)。

### 1.3 BCL6 蛋白原核表达及鉴定

根据 GenBank 中猪 BCL6 开放阅读框 (XM\_003358748.4) 提供的氨基酸序列,以限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 为酶切位点,由擎科生物技术有限公司优化密码子并合成重组载体。使用 Primer 5.0 软件设计引物,上游引物 (5'  $\rightarrow$  3'): CCCGGTACCATG-GCGTCTCCAGCTGATAGCT, 下游引物 (5'  $\rightarrow$  3'): GGCGAGCTCCGTGCGAAAGCCGTCAA, 下划线处分别为 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点。PCR 扩增体系: 2 $\times$  Rapid Taq Master Mix 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5  $\mu$ L, BCL6 cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 52  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 22 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。产物进行琼脂糖凝胶电泳。pET-30a 载体和纯化产物均用

*Kpn* I 和 *Xho* I 进行酶切, 纯化后的产物连接, 转化, 接种卡那霉素 LB 平板。挑单菌落鉴定, 将阳性菌液测序, 测序正确, 将其命名为 pET-30a-BCL6。将重组载体 pET-30a-BCL6 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单克隆菌落摇菌, 当菌液  $OD_{600\text{nm}}$  值为 0.6~0.8 时加入 IPTG 进行诱导。诱导 8 h 后经 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 超声破碎菌体, 经 SDS-PAGE 鉴定蛋白的表达。将包涵体形式表达的蛋白用 8 mol/L 尿素溶解, 再经尿素浓度逐级降低透析复性蛋白。采用 Ni-NTA 方法纯化蛋白, 一是将纯化的 BCL6 蛋白经 SDS-PAGE 胶转印至 PVDF 膜上, 考马斯亮蓝染色鉴定纯化的重组蛋白; 二是将纯化的 BCL6 蛋白经 SDS-PAGE 胶转印至 PVDF 膜上, SDS-PAGE 后转膜 1 h, 使用 TBST 封闭 1 h, PBST 洗 3 遍, 利用一抗 His 抗体 (1:5 000) 4 ℃ 过夜孵育, PBST 洗 3 遍, 二抗使用抗鼠 IgG 抗体 (1:1 000) 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 遍, 使用高分辨率图像采集系统显影并采集图像, 使用 Western blot 方法鉴定纯化的重组蛋白。

#### 1.4 BCL6 蛋白多克隆抗血清的制备

将纯化的蛋白 BCL6 与 206 佐剂等体积混合并利用三通装置乳化后经背部皮下多点免疫 BALB/c 小鼠, 每只注射 100  $\mu\text{g}$ , 每 2 周免疫 1 次, 共免疫 4 次, 在第 4 次免疫后 1 周经眼球采血收集抗血清。首次免疫前经断尾收集血清作为阴性对照, 二免、三免和四免前断尾收集血清分别作为一免、二免和三免后血清样品。四免后 1 周通过眼球采血收集抗血清, 采用 ELISA 检测抗血清的抗体水平变化, 及四免后抗血清的抗体滴度。

#### 1.5 BCL6 蛋白的真核表达鉴定

根据 GenBank 中猪 BCL6 开放阅读框 (XM\_003358748.4) 提供的氨基酸序列, 以限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xba* I 为酶切位点, 由擎科生物技术有限公司优化密码子并合成重组载体。使用 Primer 5.0 软件设计引物, 上游引物 (5'→3'): CCCGAATTCATGCGCTCTCCAGCTGATAGCT, 下游引物 (5'→3'): GGCAGATCTCGTCCGAAAGCCGTCAG, 下划线处分别为 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切位点。PCR 扩增体系: 2 $\times$  Rapid Taq Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , BCL6 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 22 s, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。产物进行琼脂糖凝胶电泳。pcDNA3.1 载体和纯化产物均用 *Kpn* I 和 *Xho* I 进行酶切, 纯化后的产物连接, 转化, 接种卡那霉素 LB 平板。挑单菌落鉴定, 将阳性菌液测序, 测序正确, 将其命名为 pcDNA3.1-BCL6。将

鉴定正确的重组载体 pcDNA3.1-BCL6 转化入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取单菌落摇菌, 提取质粒, 将 pcDNA3.1-BCL6 转染 HEK-293T 细胞, 转染 36 h 后弃掉细胞培养液, 用 PBST 洗细胞 3 遍, 加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, PBST 洗细胞 3 遍, 加入 1% Tritonx-100 室温透膜 30 min, PBST 洗细胞 3 遍, 加入 2% BSA 室温封闭 1 h, 加入小鼠抗 His 抗体 (1:5 000) 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 遍, 加入 CoraLite<sup>®</sup> 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:1 000) 室温孵育 1 h, 利用荧光显微镜观察荧光信号。HEK-293T 细胞于转染后 48 h 弃掉培养液, 用 PBS 洗 3 遍, 利用 NP40 在冰上裂解细胞, 在 4 ℃ 条件下经 10 000 r/min 离心去除细胞碎片收集上清液, 加入 Loading buffer 煮沸 10 min 以制备蛋白样品。将获得的蛋白样品经 SDS-PAEG 后转印至 PVDF 膜上, 利用 5% 的脱脂乳于 4 ℃ 过夜封闭 PVDF 膜, 利用小鼠抗 His 抗体 (1:5 000) 室温孵育膜 1 h, PBST 洗 3 遍, 加入 HRP 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (1:5 000) 室温孵育膜 1 h, PBST 洗 3 遍, 利用 ECL 显色检测目的蛋白。

#### 1.6 抗血清特异反应性的验证

将重组载体 pcDNA3.1-BCL6 转染 HEK-293T 细胞, 分别利用间接免疫荧光 (IFA) 和 Western blot 检测抗血清的反应性。Western blot 试验步骤如 1.3 中所述, IFA 试验步骤如 1.5 中所述。IFA 试验中一抗为制备的抗血清, 稀释比例为 1:500, 二抗为 CoraLite<sup>®</sup> 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 稀释度为 1:2 000。Western blot 试验中一抗为 1:2 000 稀释的所制备抗血清, 二抗为 1:5 000 稀释 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体。

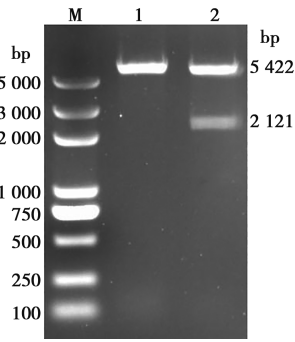
#### 1.7 数据与统计分析

采用 GraphPad Prism 9.5.0 进行数据的统计分析, 当 *P* 值大于 0.05 时, 表明具有统计学意义。数据以“平均数±标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 BCL6 蛋白的原核表达载体鉴定

对 BCL6 基因进行大肠杆菌密码子优化, 然后合成重组载体 pET-30a-BCL6。利用 *Kpn* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 琼脂糖核酸电泳结果显示, 重组载体被切成 2 条带, BCL6 的条带大小为 2 121 bp, 与预期相符 (图 1)。测序结果显示, 克隆入载体的 BCL6 序列与参考序列完全一致 (图 2), 证实重组载体构建成功。

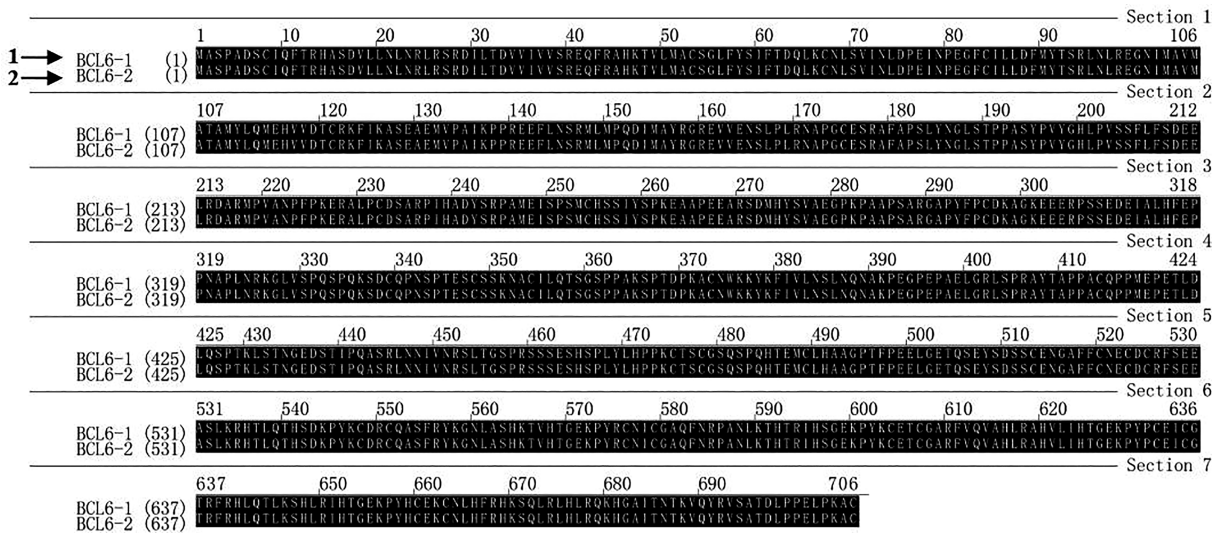


M. DNA 分子质量标准; 1. 空载体 pET-30a (+); 2. 重组载体 pET-30a-BCL6。

## 2.2 BCL6 蛋白的原核表达及纯化

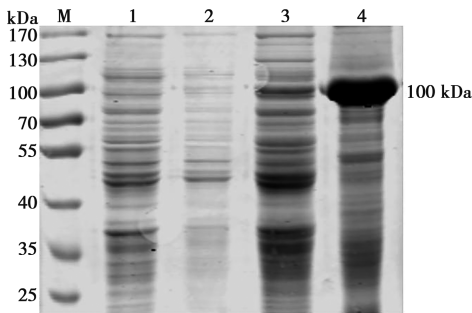
重组载体 pET-30a-BCL6 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 收集 IPTG 诱导前后菌体, 将菌体超声裂解后离心制备上清液和沉淀样品, SDS-PAGE 后经考马斯亮蓝染色, 蛋白大小预期为 100 kDa。结果显示, 经 IPTG 诱导后沉淀中有与预期大小相符的目的条带 (图 3), 表明 BCL6 蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式成功表达。

图 1 重组载体 pET-30a-BCL6 的酶切鉴定



1. BCL6-1 为优化前 BCL6 氨基酸序列; 2. BCL6-2 为优化后 BCL6 氨基酸序列。

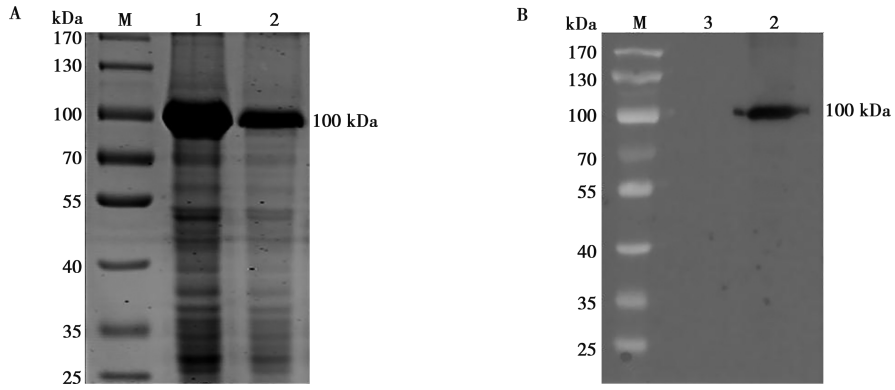
图 2 BCL6 核苷酸编码的氨基酸序列优化前后比对



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 诱导前菌体裂解上清液; 2. 诱导前菌体裂解沉淀; 3. 诱导后菌体裂解上清液; 4. 诱导后菌体裂解沉淀。

图 3 BCL6 蛋白的原核表达鉴定

将以包涵体形式表达的 BCL6 蛋白溶解于 8 mol/L 尿素中, 再逐级降低尿素浓度透析复性蛋白。将复性后的蛋白通过 Ni-NTA 亲和层析的方式进行纯化, 采用 SDS-PAGE 检测蛋白纯化效果。结果显示成功得到相对纯净的目的蛋白 (图 4A), 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 显示纯化后的 BCL6 重组蛋白浓度为 0.65 mg/mL。将纯化的 BCL6 蛋白经 SDS-PAGE 胶转印至 PVDF 膜上, 利用 His 标签抗体进行孵育, Western blot 结果显示纯化后的 BCL6 蛋白在 100 kDa 处出现特异条带, 大小与预期相符 (图 4B)。



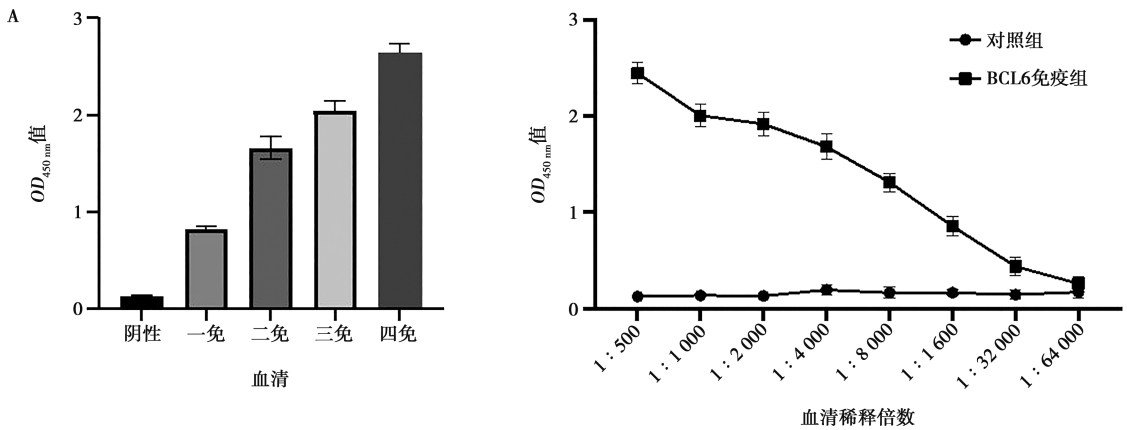
M. 蛋白质分子质量标准; 1. 纯化前 BCL6 蛋白; 2. 纯化后 BCL6 蛋白; 3. pET-30a 空载体蛋白。

图 4 BCL6 纯化蛋白的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 鉴定

### 2.3 抗血清的制备

按照时间点收集免疫前后的小鼠血清，将纯化后的 BCL6 蛋白作为抗原，采用 ELISA 方法检测血清抗体滴度的变化。结果显示，血清抗体水平随着免疫次数的增加而逐渐上升（图 5A）。在第 4 次免疫后 1

周，通过眼球采血收集血清，采用 ELISA 方法检测血清抗体滴度，以 P/N 值  $\geq 2.1$  判定为阳性。如图 5B 所示，血清稀释度为 1 : 32 000 时 P/N 值  $< 2.1$ ，因此判定血清中抗体效价为 1 : 16 000。



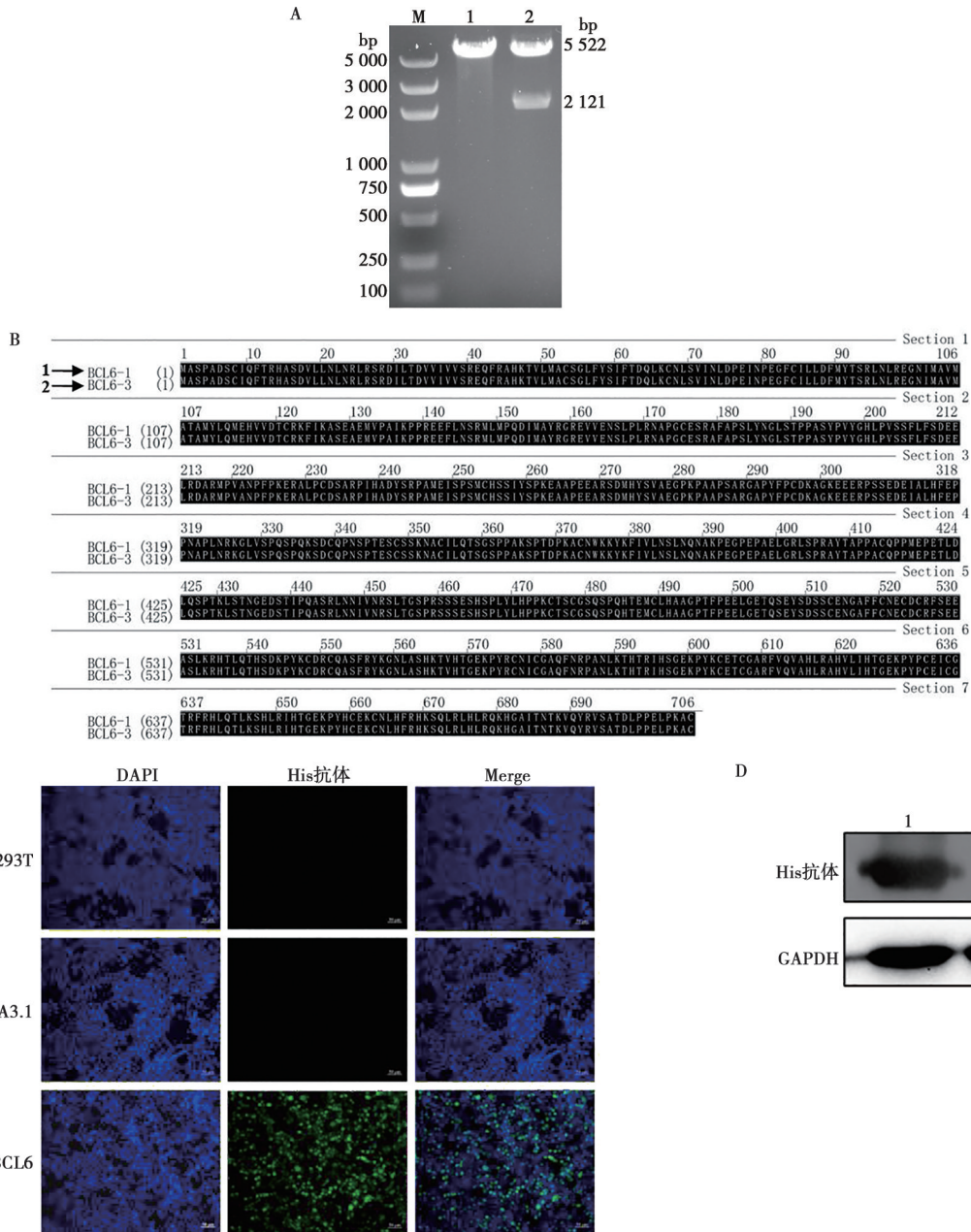
A. 血清中抗体水平变化检测; B. 血清中抗体滴度鉴定。

图 5 猪 Tfh 细胞转录因子 BCL6 抗血清的鉴定

### 2.4 BCL6 蛋白的真核表达鉴定

对 BCL6 基因进行人源 293T 细胞系密码子优化后，合成重组载体 pcDNA3.1-BCL6，利用 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶进行双酶切验证，结果显示重组载体被切成 2 条带，BCL6 条带大小为 2 121 bp，与预期相符（图 6A）。测序结果显示克隆入重组载体的 BCL6 序列与参考序列完全一致（图 6B）。将验证正确的重组载体

pcDNA3.1-BCL6 转染 HEK-293T 细胞，经 IFA 检测 BCL6 蛋白的表达（抗 His 抗体为一抗），结果显示重组载体 pcDNA3.1-BCL6 转染组有特异性荧光（图 6C）。经 Western blot 检测 BCL6 蛋白的表达（抗 His 抗体为一抗），试验组重组载体 pcDNA3.1-BCL6 在 100 kDa 处出现特异性目的条带（图 6D），证明 BCL6 蛋白在 HEK-293T 细胞中成功表达。



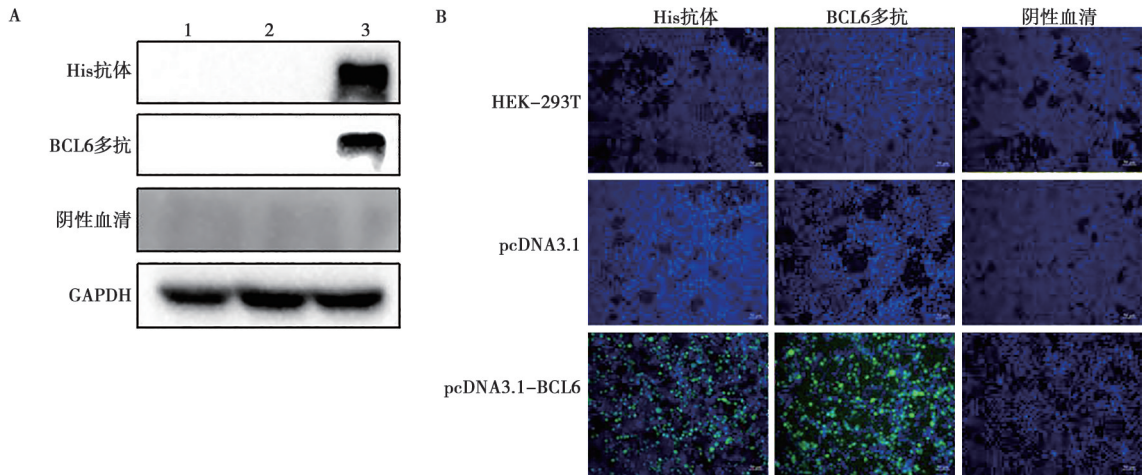
A. pcDNA3.1-BCL6 的双酶切鉴定；M. DNA 分子质量标准；1. 空载体 pcDNA3.1；2. 重组载体 pcDNA3.1-BCL6。  
 B. BCL6 核苷酸编码的氨基酸优化前后序列比对；1. 优化前 BCL6 氨基酸序列；2. 优化后 BCL6 氨基酸序列。  
 C. 重组载体 pcDNA3.1-BCL6 表达的 IFA 验证（标尺=50 μm）。  
 D. 重组载体 pcDNA3.1-BCL6 表达的 Western blot 验证；1. 重组载体 pcDNA3.1-BCL6；2. 空载体 pcDNA3.1。

图 6 BCL6 蛋白在 293T 细胞中的表达鉴定

### 2.5 抗血清特异反应性的鉴定

为验证制备的抗血清的特异反应性，将验证成功表达 BCL6 蛋白的重组载体 pcDNA3.1-BCL6 转染 HEK-293T 细胞，经 Western blot 和 IFA 检测抗血清的特异反应性（抗血清为一抗）。结果显示，Western

blot 检测试验组重组载体 pcDNA3.1-BCL6 在 100 kDa 处出现特异性目的条带（图 7A），重组载体 pcDNA3.1-BCL6 转染组有特异性荧光（图 7B），表明抗血清与 BCL6 蛋白具有良好的反应性。



A. 抗血清特异反应性的 Western blot 验证; 1. 细胞对照; 2. 空载体 pcDNA3.1; 3. 重组载体 pcDNA3.1-BCL6;  
B. 抗血清特异反应性的 IFA 验证 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ )。

图7 猪 Tfh 细胞转录因子 BCL6 抗血清特异反应性验证

### 3 讨论

早在 1968 年有研究就发现机体有效产生抗体需要 T 细胞的帮助。约 30 年后,有研究报道 CXCR5<sup>+</sup> T 细胞会迁移至 B 细胞滤泡,可以促进 B 细胞产生抗体。经过近几年的研究,特别是谱系转录因子 BCL6 的发现,被作为 Tfh 的细胞标志物被广泛关注,其在小鼠和人体内的发育过程、功能作用等逐渐被揭示。相关研究表明, Tfh 细胞通过表达趋化因子受体 CXCR5 以及表面分子等来维持其功能,并参与体液免疫的调节过程。在 GC 内, Tfh 细胞对 B 细胞的增殖分化和产生的效应抗体起到辅助作用,并调控免疫应答,这对 B 细胞的完整反应至关重要<sup>[20]</sup>。转录因子 BCL6 被认定为 Tfh 细胞的特征性功能标志物,抑制 BCL6 有改善 Tfh 介导的自身免疫性疾病的潜能<sup>[22]</sup>。越来越多的研究表明,抑制 BCL6 的小分子调节剂可有效抑制多种淋巴瘤、急性髓系白血病以及肺癌等实体瘤的发生发展或缓解其化学耐药,这充分说明 BCL6 调节剂在肿瘤治疗中具有很大潜力。研究表明,在 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 BCL6 缺失后,该细胞不能分化为 Tfh 细胞<sup>[7,23]</sup>,这表明 BCL6 在 T 细胞分化和发育过程中起着至关重要的作用。

BCL6 可精细调控 Tfh 细胞的分化和极化,确保 Tfh 细胞在免疫应答中正常发挥功能。BCL6 的异常表达或缺失均会导致 Tfh 细胞的异常增殖和分化。同时,研究证实 Blimp1 和 BCL6 是有效的相互拮抗剂<sup>[7]</sup>。当前,研究人员在 Tfh 细胞研究领域取得了诸多关键性发现,这些发现将有助于深入了解 Tfh 细胞的作用机制,以及区别正常和异常的 Tfh 细胞生物学

特征。然而,目前对于猪 Tfh 细胞的生物学特征仍缺乏清晰的认识,亟待进一步研究和探索。

在本研究中 BCL6 蛋白以包涵体的形式表达,通过利用尿素溶解包涵体蛋白对蛋白进行变性,再用浓度逐级减小的尿素溶液透析,得到具有一定活性的目的蛋白。免疫小鼠后收集血清,ELISA 检测结果显示 BCL6 蛋白均具有较好的免疫原性,可以有效刺激小鼠机体产生抗体。为验证本研究所制备多克隆抗体的应用性,利用 BCL6 基因的真核表达载体,在 293T 细胞中表达 BCL6 蛋白,经 IFA 与 Western blot 检测,发现与 BCL6 蛋白制备的多克隆抗体有良好的反应性。

综上,鉴于 BCL6 在 Tfh 细胞分化和功能中关键调控作用,为深入探究猪 Tfh 细胞分化和功能机制,本研究利用表达的猪 BCL6 蛋白,通过免疫小鼠后制备了针对猪 BCL6 蛋白的特异性抗血清,并对抗血清进行了验证。本研究成功制备猪 BCL6 的抗血清,为猪 Tfh 细胞的相关研究提供了物质材料。

### 参考文献:

- [1] SCHAERLI P, WILLIMANN K, LANG A B, et al. CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function [J]. *J Exp Med*, 2000, 192 (11): 1553-1562.
- [2] KIM C H, ROTT L S, CLARK-LEWIS I, et al. Subspecialization of CXCR5<sup>+</sup> T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5<sup>+</sup> T cells [J]. *J Exp Med*, 2001, 193 (12): 1373-1381.
- [3] BREITFELD D, OHL L, KREMMER E, et al. Follicular B helper

- T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production [J]. *J Exp Med*, 2000, 192 (11): 1545-1552.
- [4] MURPHY K M, REINER S L. The lineage decisions of helper T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (12): 933-944.
- [5] WEAVER C T, HATTON R D, MANGAN P R, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 821-852.
- [6] ZHU J, PAUL W E. CD4 T cells: fates, functions, and faults [J]. *Blood*, 2008, 112 (5): 1557-1569.
- [7] JOHNSTON R J, POHOLEK A C, DITORO D, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation [J]. *Science*, 2009, 325 (5943): 1006-1010.
- [8] NURIEVA R I, CHUNG Y, MARTINEZ G J, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells [J]. *Science*, 2009, 325 (5943): 1001-1005.
- [9] YU D, RAO S, TSAI L M, et al. The transcriptional repressor bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment [J]. *Immunity*, 2009, 31 (3): 457-468.
- [10] GATTO D, BRINK R. The germinal center reaction [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126 (5): 898-907.
- [11] KITANO M, MORIYAMA S, ANDO Y, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity [J]. *Immunity*, 2011, 34 (6): 961-972.
- [12] CHOI J, CROTTY S. Bcl6-mediated transcriptional regulation of follicular helper T cells (T<sub>FH</sub>) [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42 (4): 336-349.
- [13] NURIEVA R I, CHUNG Y, HWANG D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages [J]. *Immunity*, 2008, 29 (1): 138-149.
- [14] FAZILLEAU N, MCHEYZER-WILLIAMS L J, ROSEN H, et al. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10 (4): 375-384.
- [15] DEENICK E K, CHAN A, MA C S, et al. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling [J]. *Immunity*, 2010, 33 (2): 241-253.
- [16] WEBER J P, FUHRMANN F, FEIST R K, et al. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2 [J]. *J Exp Med*, 2015, 212 (2): 217-233.
- [17] CHOI J, DIAO H, FALITI C E, et al. Bcl-6 is the nexus transcription factor of T follicular helper cells via repressor-of-repressor circuits [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21 (7): 777-789.
- [18] CROTTY S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases [J]. *Immunity*, 2019, 50 (5): 1132-1148.
- [19] CHOI Y S, GULLICKSRUD J A, XING S, et al. LEF-1 and TCF-1 orchestrate T (FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6 [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16 (9): 980-990.
- [20] WU T, SHIN H M, MOSEMAN E A, et al. TCF1 is required for the T follicular helper cell response to viral infection [J]. *Cell Rep*, 2015, 12 (12): 2099-2110.
- [21] XU L, CAO Y, XIE Z, et al. The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of TFH cells during acute viral infection [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16 (9): 991-999.
- [22] SUN Q, CAI D, LIU D, et al. BCL6 promotes a stem-like CD8<sup>+</sup> T cell program in cancer via antagonizing BLIMP1 [J]. *Sci Immunol*, 2023, 8 (88): eadh1306.
- [23] LI Y, WANG Z, LIN H, et al. Bcl6 preserves the suppressive function of regulatory T cells during tumorigenesis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 806.