

余艳玲, 冯鹏霏, 潘传燕, 等. 尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2019, 35( 6 ): 1407-1412.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.020

## 尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备

余艳玲, 冯鹏霏, 潘传燕, 陈晓汉, 林 勇, 张永德, 罗洪林

(广西水产科学研究院广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁 530021)

**摘要:** 为制备尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 多克隆抗体, 采用同源重组技术构建尼罗罗非鱼 pET-B2m-TGF- $\beta$ 1 原核表达载体, 转入大肠杆菌 B21 中诱导表达, 将重组表达蛋白质纯化后免疫大耳兔制备多克隆抗体, 采用 Western Blot 和 ELISA 检测抗体的特异性和效价。结果表明, 构建的 pET-B2m-TGF- $\beta$ 1 原核表达载体经诱导表达获得了分子量为  $5.2 \times 10^4$  的重组蛋白质, 免疫大耳兔获得效价为 1 : 2 048 000 的抗尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 多克隆抗血清, 该抗体能够特异性地识别原核表达的 TGF- $\beta$ 1 蛋白。

**关键词:** 罗非鱼; TGF- $\beta$ 1 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

**中图分类号:** S965.125 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1407-06

## Prokaryotic expression and polyclonal antibodies preparation of TGF- $\beta$ 1 protein in Nile tilapia

YU Yan-ling, FENG Peng-fei, PAN Chuan-yan, CHEN Xiao-han, LIN Yong, ZHANG Yong-de, LUO Hong-lin

(Guangxi Key Laboratory for Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China)

**Abstract:** To prepare the polyclonal antibody against TGF- $\beta$ 1 of Nile tilapia, the TGF- $\beta$ 1 gene of Nile tilapia was transferred into the prokaryotic expression vector pET-B2m using homologous recombination technology, and transferred into *Escherichia coli* B21 for expression. The expressed TGF- $\beta$ 1 protein was purified and used to immunize rabbits for the preparation of polyclonal antibodies. The specificity and potency of the antibody were detected by Western blot and ELISA. The results showed that the pET-B2m-TGF- $\beta$ 1 prokaryotic expression vector was successfully constructed, and the recombinant protein with the molecular weight of  $5.2 \times 10^4$  was obtained by inducing expression. The anti-Nile tilapia TGF- $\beta$ 1 polyclonal antiserum with a potency of 1 : 2 048 000 was obtained from the immunized rabbit. The antibody could specifically recognize the prokaryotically expressed TGF- $\beta$ 1 protein.

**Key words:** tilapia; TGF- $\beta$ 1 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

TGF- $\beta$  超家族是由一类结构相关, 具有共同生物学特性的细胞因子组成<sup>[1]</sup>, 在免疫细胞功能调

节<sup>[2]</sup>, 细胞增殖、分化和迁移<sup>[3-5]</sup>, 细胞衰老和凋亡<sup>[6-7]</sup>, 骨、血管及脂肪生成<sup>[8-10]</sup>, 以及组织重塑和修复中发挥重要的作用<sup>[11-13]</sup>, 且与许多疾病有关<sup>[3, 14-15]</sup>。目前鉴定的 TGF- $\beta$  超家族成员已超过 30 多个, 而且在无脊椎动物中有十几种结构和功能相关的成员<sup>[16-17]</sup>。基于结构的同源性, TGF- $\beta$  超家族成员被分为多个亚型。目前已在哺乳动物和鸟类中鉴定了 3 种 TGF- $\beta$  亚型, 在非洲爪蟾中鉴定了 2 种,

收稿日期: 2019-03-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31760765、31372553); 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139068)

作者简介: 余艳玲(1976-), 女, 陕西咸阳人, 工程师, 主要从事水产动物分子生物学研究。(E-mail) yaeling@126.com

通讯作者: 罗洪林, (E-mail) 541365548@qq.com

在硬骨鱼中鉴定了4种。在这些亚型中,TGF- $\beta$ 1可能是免疫系统中起主要作用的亚型<sup>[18]</sup>,TGF- $\beta$ 1可刺激促炎细胞因子(Tnf $\alpha$ 和Ifn $\gamma$ )、T/B细胞标记物(Cd4l、Cd8 $\alpha$ 、Cd8 $\beta$ 和Ig $\mu$ ),以及IL-10与MHC的表达<sup>[19-21]</sup>,抑制ALK5的表达<sup>[20]</sup>,诱导外周血淋巴细胞(PBL)增殖<sup>[19]</sup>,抑制炎症反应中的IL-1 $\beta$ 信号的传导<sup>[22]</sup>,响应免疫调节剂<sup>[23]</sup>,而且可抑制细菌诱导的IL-1 $\beta$  mRNA表达,在控制鱼类炎症过程中发挥重要的作用<sup>[22]</sup>。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是中国最重要的经济养殖鱼类之一。然而,近年来无乳链球菌的爆发对罗非鱼的养殖产业造成了巨大的经济损失,严重阻碍了中国罗非鱼产业的健康发展<sup>[23]</sup>。因此,加强罗非鱼免疫学相关研究,探讨细胞因子在罗非鱼免疫防御机制中的作用,对利用免疫控制技术控制罗非鱼疾病意义重大。尼罗罗非鱼的TGF- $\beta$ 1基因已经被克隆与鉴定<sup>[24]</sup>,然而由于缺乏相应的特异性抗体,TGF- $\beta$ 1在罗非鱼免疫中的功能研究受到了许多限制。本研究对尼罗罗非鱼TGF- $\beta$ 1基因进行原核表达,并通过免疫大耳兔制备罗非鱼TGF- $\beta$ 1多克隆抗体,为研究罗非鱼TGF- $\beta$ 1蛋白的功能和免疫机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒pET-B2m与表达载体B21购自武汉金开瑞生物工程有限公司,内切酶BamH I、Sal I、DNA聚合酶、蛋白质marker购自Fermentas公司(美国),In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit购自TaKaRa公司,质粒提取试剂盒、DNA回收试剂盒购自天根生物技术公司,IPTG购自Merck公司(德国),硝酸纤维素膜(Polyvinylidene fluoride, PVDF)购自Thermo Fisher公司(美国),弗式完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自Sigma公司(美国),辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔抗体购自Jackson公司(美国),亲和层析柱购自GE Healthcare公司(美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 蛋白质结构分析及抗原表位预测 采用ExPASy中的ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)预测尼罗罗非鱼TGF- $\beta$ 1蛋白的疏水性,采用TMHMM server v.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/>

services/TMHMM-2.0/)预测跨膜区,采用DNASTar 7.1软件预测分析亲水性、抗原指数等。

1.2.2 目的基因的扩增与表达质粒的构建 利用Primer Premier 5.0软件,根据尼罗罗非鱼TGF- $\beta$ 1基因序列(NCBI No. NM\_001311325)设计1对特异性PCR引物,引物上、下游序列(P1、P2)分别为5'-TC-CACTGGGTTCTCGGACTATGCTGAGCACCTGTAAT-3'和5'-TAAGGCCGCACTCGAGCACCACCTTAGCTG-CATTTACAGCT-3'。尼罗罗非鱼TGF- $\beta$ 1基因1 086 bp序列由上海生工生物公司合成,以此为模板进行PCR扩增获得目的基因片段。载体pET-B2m经Sal I与BamH I双酶切处理后,采用同源重组的方法构建重组质粒pET-B2m-TGF- $\beta$ 1,转化感受态大肠杆菌B21,挑选阳性克隆进行PCR扩增、电泳检测及测序,采用mega X进行序列比对分析,以确认目的基因正确插入载体。

1.2.3 重组蛋白质的诱导表达 参考文献[25],将构建的重组菌阳性克隆接入LB培养基进行小量诱导表达,取部分菌液作为对照,剩余菌液加入IPTG诱导剂进行诱导培养,然后取菌体1 ml进行离心及破菌处理,以空菌株作为对照,对总菌、沉淀及上清液进行SDS-PAGE电泳检测分析。经检测,目的基因显著表达后,取过夜培养的菌液2 ml加入2 000 ml LB培养基中进行大量诱导表达,然后收集发酵液,离心收集菌体。菌体经超声波破碎后,收集上清液以及沉淀,分别取少量样品进行电泳检测。

1.2.4 多克隆抗体的制备及鉴定 采用Ni-NTA树脂层析柱对收集的上清液及沉淀进行纯化,将纯化的重组蛋白质免疫大耳兔制备抗血清。以重组TGF- $\beta$ 1蛋白作为抗原,与以1:2 000、1:4 000、1:8 000作二倍梯度稀释至1:8 192 000的待检血清进行抗原抗体反应,最后加入HRP标记的羊抗兔IgG(1:5 000)作为二抗进行ELISA反应,确定待测样品的效价。采用Western Blot方法检测TGF- $\beta$ 1日本大耳兔抗血清特异性,最后以Protein G亲和层析柱进行抗体纯化。

## 2 结果与分析

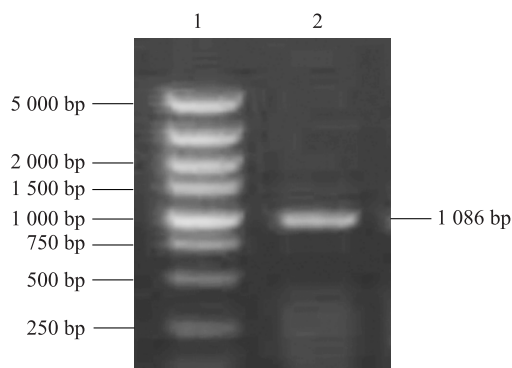
### 2.1 TGF- $\beta$ 1蛋白结构及抗原表位分析

尼罗罗非鱼TGF- $\beta$ 1基因编码381个氨基酸。抗原表位分析结果显示,TGF- $\beta$ 1蛋白亲水性平均值(GRAVY)为-0.545,表明该蛋白质为亲水性蛋白质。

TGF- $\beta$ 1 蛋白无跨膜区,其 381 个氨基酸均位于细胞膜表面,可降低跨膜区疏水性氨基酸折叠蛋白质几率,有利于该蛋白质的表达和纯化研究。TGF- $\beta$ 1 蛋白存在丰富的潜在抗原表位点,说明利用该蛋白质进行抗体制备是可行的。

## 2.2 TGF- $\beta$ 1 表达载体的构建与鉴定

以 pET-B2m-TGF- $\beta$ 1 质粒为模板,对 TGF- $\beta$ 1 基因进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得一大小约为 1 086 bp 的目的片段(图 1),与预期片段大小一致。将 PCR 扩增产物纯化测序,经序列比对分析,确定 TGF- $\beta$ 1 基因已正确插入载体 pET-B2m 中。



1:DL2 000 plus DNA marker; 2:TGF- $\beta$ 1 扩增产物。

图 1 尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 基因表达载体的 PCR 检测

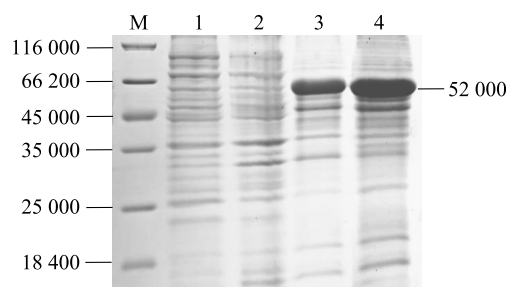
Fig.1 PCR amplification of TGF- $\beta$ 1 gene expression vector in Nile tilapia

## 2.3 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白的表达与鉴定

对转入的尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 基因进行小量诱导表达,经破菌分离及电泳检测分析,分离的沉淀与总菌中均在分子量  $5.2 \times 10^4$  处出现 1 条显著的蛋白质条带,与重组蛋白质的预期大小一致,而对照组与上清液中未检测到显著的蛋白质条带(图 2)。随后对重组蛋白质进行了大量诱导表达及 SDS-PAGE 电泳,结果显示,与上清液中的蛋白质条带相比,沉淀中的蛋白质条带更粗,染色更深,说明重组蛋白质主要处于沉淀中,以包涵体的形式存在(图 3)。

## 2.4 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白的提取与纯化

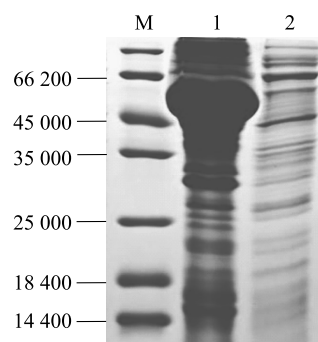
对原核表达的尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白进行破菌提取与纯化,经 10 倍稀释后进行 SDS-PAGE 电泳。结果(图 4)显示,检测样品于  $5.2 \times 10^4$  处有一清晰的带纹,与预期蛋白质大小吻合。



M:蛋白质 marker;1:空质粒菌株;2:上清液;3:沉淀;4:重组菌总菌。

图 2 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白的小量表达 SDS-PAGE 电泳结果

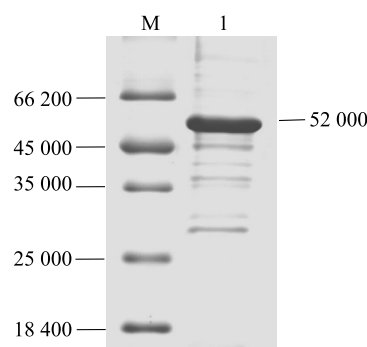
Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis results and expression of TGF- $\beta$ 1 recombinant protein in small quantity



M:蛋白质 marker;1:沉淀中的 TGF- $\beta$ 1 蛋白;2:上清液中的 TGF- $\beta$ 1 蛋白。

图 3 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白的大量表达及 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis results and large-scale expression of TGF- $\beta$ 1 recombinant protein



M:蛋白质 marker;1:纯化的 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白。

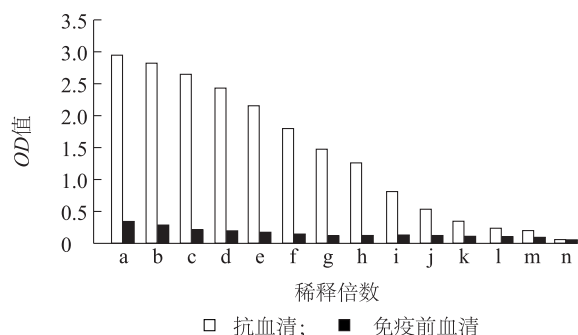
图 4 尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified Nile tilapia TGF- $\beta$ 1 recombinant protein

## 2.5 TGF- $\beta$ 1 蛋白血清抗体的免疫效价

纯化后的重组蛋白质经碳酸盐缓冲液包被后免

疫日本大耳兔制备罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 多克隆抗体,采用 ELISA 法检测抗体效价。结果显示,TGF- $\beta$ 1 多克隆抗体的效价为1:2 048 000(图 5)。表明采用该重组蛋白质诱导日本大耳兔产生了良好的免疫反应,获得了效价较高的 TGF- $\beta$ 1 多克隆抗体。



a:1:2 000;b:1:4 000;c:1:8 000;d:1:16 000;e:1:32 000;f:1:64 000;g:1:128 000;h:1:256 000;i:1:512 000;j:1:1 024 000;k:1:2 048 000;l:1:4 096 000;m:1:8 192 000;n:稀释液。

图5 尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 蛋白多克隆抗体效价

Fig.5 Titer of polyclonal antibody against TGF- $\beta$ 1 protein of Nile tilapia

## 2.6 重组蛋白 TGF- $\beta$ 1 抗血清的特异性

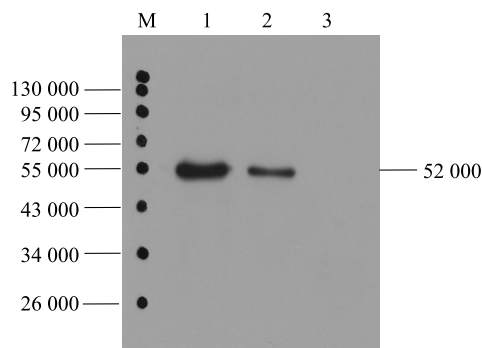
采用 Western Blot 方法检测 TGF- $\beta$ 1 抗血清特异性。结果(图 6)表明,25 ng 和 10 ng 重组蛋白质组均出现一条清晰的反应条带,蛋白质大小均约为  $5.2 \times 10^4$ ,其中 25 ng 组蛋白质条带更清晰,而对照组相应位置未见反应条带,说明 TGF- $\beta$ 1 抗原与血清中的抗体可以特异地结合,且其特异性较强。

## 2.7 TGF- $\beta$ 1 抗体的纯度

对收集到的抗血清以 Protein G 亲和层析柱进行 2 次纯化,收集抗体,经 4 倍稀释后采用 SDS-PAGE 电泳检测。检测结果(图 7)显示 2 条清晰的带纹,其中一条带纹大小约为  $5.0 \times 10^4$ ,另一条带纹约为  $2.5 \times 10^4$ ,片段大小与抗体的重链与轻链大小相符合,未见杂带。经检测,纯化后的抗体质量浓度达 10 mg/ml 以上,纯度约为 95%,抗体纯度较高。

## 3 讨论

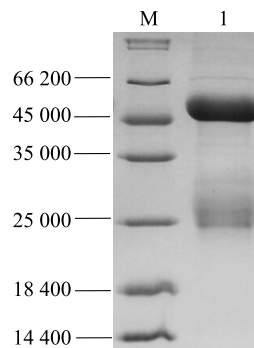
TGF- $\beta$ 1 蛋白在机体中具有多种重要的生理作用,其结构和功能受到了越来越多的关注。然而,机体组织中蛋白质的低丰度致使不能从天然来源获得令人满意的 TGF- $\beta$ 1 蛋白的量,这就限制了对其更



M:蛋白质 Marker; 1:25 ng 纯化的重组蛋白; 2:10 ng 纯化的重组蛋白; 3:阴性对照。

图6 尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 多克隆抗体的 Western Blot 检测

Fig.6 Western blot analysis of TGF- $\beta$ 1 polyclonal antibody in Nile tilapia



M:蛋白质 Marker; 1:纯化的 TGF- $\beta$ 1 抗体。

图7 纯化的 TGF- $\beta$ 1 抗体 SDS-PAGE 电泳检测

Fig.7 SDS-PAGE electrophoresis of purified TGF- $\beta$ 1 antibody

深入的研究。显然,异源表达是天然获取的有效替代方法<sup>[26]</sup>,而且是生产大量所需重组蛋白质的简单而廉价的手段。尼罗罗非鱼 TGF- $\beta$ 1 蛋白编码 381 个氨基酸,通过对该蛋白质结构分析及抗原表位预测发现,该蛋白质理论分子量为  $4.415 \times 10^4$ ,理论等电点为 8.05,GRVY 为 -0.545,为亲水性蛋白质,亲水性较强,无典型的跨膜区,这些结果都表明,该蛋白质适合进行原核表达和抗体的制备。

PCR 技术的不断发展和完善,使得具有已知核酸序列基因的克隆已变得非常容易。相比之下,蛋白质的表达和纯化更难,因为它涉及许多问题,如最佳表达生物体的选择,高效表达载体的选择和构建,最适生长条件的筛选,有效的纯化策略等,这些取决于蛋白质的特征和下游需求<sup>[27]</sup>。本研究采用武汉金开瑞生物公司提供的表达载体 pET-B2m 进行无



缝克隆和原核表达,结果表明,采用该载体,TGF- $\beta$ 1 可以高效表达,但沉淀中蛋白质含量显著高于上清液中蛋白质含量。利用 Ni-NTA 树脂层析柱进行重组蛋白质纯化,结果表明纯化效果较好。TGF- $\beta$ 1 重组蛋白的获得,不仅是制备抗体的基础,也为进一步深入研究该蛋白质提供了研究素材。

胞内表达的重组蛋白质,在胞质中或以可溶性形式存在,或聚集成不溶性的包涵体,或以两种形式存在<sup>[28]</sup>。其中可溶性蛋白质通常是有活性的,而包涵体中的蛋白质常常被错误折叠而失活<sup>[29]</sup>。然而,最近的研究结果表明,包涵体中的大部分蛋白质是有功能的,可以用于多种应用而不用溶解和重新折叠<sup>[30]</sup>。本研究结果表明,大量表达的 TGF- $\beta$ 1 蛋白多以包涵体形式存在,超声破碎后存在于沉淀中,而上清液中的蛋白质或未检测到或含量较少。形成包涵体的主要原因可能是高转化率使得细胞质内蛋白质保持高浓度并允许部分折叠的蛋白质分子彼此相互作用形成聚集体<sup>[31]</sup>;另外,包涵体的形成还与蛋白质的氨基酸序列有关,高度疏水性的蛋白质具有更多聚集成包涵体的机会<sup>[32]</sup>。本研究的主要目的是获得特异性的 TGF- $\beta$ 1 抗体,因此,包涵体的存在对抗体的形成影响不大。

#### 参考文献:

- [1] MASSAGUÉ J. TGF- $\beta$  signal transduction[J]. Annual Review of Biochemistry, 1998, 67: 753-791.
- [2] STEPHEN T L, RUTKOWSKI M R, ALLEGREZZA M J, et al. Transforming growth factor  $\beta$ -mediated suppression of antitumor T cells requires FoxP1 transcription factor expression[J]. Immunity, 2014, 41(3): 427-439.
- [3] BARCELLOS-HOFF M H, CUCINOTTA F A. New tricks for an old fox: impact of TGF $\beta$  on the DNA damage response and genomic stability[J]. Science Signaling, 2014, 7(341): re5.
- [4] HAN A, ZHAO H, LI J, et al. ALK5-mediated transforming growth factor  $\beta$  signaling in neural crest cells controls craniofacial muscle development via tissue-tissue interactions[J]. Molecular and Cellular Biology, 2014, 34(16): 3120-3131.
- [5] FENG Y, YUAN F, GUO H, et al. TGF- $\beta$ 1 enhances SDF-1-induced migration and tube formation of choroid-retinal endothelial cells by up-regulating CXCR4 and CXCR7 expression[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 397(1/2): 131-138.
- [6] WIENER Z, BAND A M, KALLIO P, et al. Oncogenic mutations in intestinal adenomas regulate Bim-mediated apoptosis induced by TGF- $\beta$ [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(21): 2229-2236.
- [7] MUÑOZ-ESPÍN D, CAÑAMERO M, MARAVER A, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development[J]. Cell, 2013, 155(5): 1104-1118.
- [8] GRAFE I, YANG T, ALEXANDER S, et al. Excessive transforming growth factor- $\beta$  signaling is a common mechanism in osteogenesis imperfecta[J]. Nature Medicine, 2014, 20(6): 670-675.
- [9] WANG J, WANG Y, WANG Y, et al. Transforming growth factor  $\beta$ -regulated microRNA-29a promotes angiogenesis through targeting the phosphatase and tensin homolog in endothelium[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(15): 10418-10426.
- [10] PARK J G, LEE D H, MOON Y S, et al. Reversine increases the plasticity of lineage-committed preadipocytes to osteogenesis by inhibiting adipogenesis through induction of TGF- $\beta$  pathway in vitro. [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 446(1): 30-36.
- [11] SULAIMAN W, NGUYEN D H. Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions[J]. Neural Regeneration Research, 2016, 11(10): 1549-1552.
- [12] WANG Y W, LIOU N H, CHERNG J H, et al. siRNA-targeting transforming growth factor- $\beta$  type I receptor reduces wound scarring and extracellular matrix deposition of scar tissue[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134(7): 2016-2025.
- [13] MUSTOE T A, PIERCE G F, THOMASON A, et al. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta[J]. Science, 1987, 237(4820): 1333-1336.
- [14] GORDON K J, BLOBE G C. Role of transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling pathways in human disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2008, 1782(4): 197-228.
- [15] CHANG A S, HATHAWAY C K, SMITHIES O, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 and diabetic nephropathy[J]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2015, 310(8): 689-696.
- [16] ATTISANO L, WRANA J L. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily[J]. Science, 2002, 296(5573): 1646-1647.
- [17] DE CAESTECKER M. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2004, 15(1): 1-11.
- [18] MARIE J C, LIGGITT D, RUDENSKY A Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- $\beta$  receptor[J]. Immunity, 2006, 25(3): 441-454.
- [19] YANG M, ZHOU H. Grass carp transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1): Molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(6): 1792-1798.
- [20] YANG M, WANG X, CHEN D, et al. TGF- $\beta$ 1 exerts opposing effects on grass carp leukocytes: implication in teleost immunity, receptor signaling and potential self-regulatory mechanisms [J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e35011.
- [21] WEI H, YANG M, ZHAO T, et al. Functional expression and

- characterization of grass carp IL-10: an essential mediator of TGF- $\beta$ 1 immune regulation in peripheral blood lymphocytes[J]. *Molecular Immunology*, 2013, 53(4): 313-320.
- [22] WANG X, YANG X, WEN C, et al. Grass carp TGF- $\beta$ 1 impairs IL-1 $\beta$  signaling in the inflammatory responses: evidence for the potential of TGF- $\beta$ 1 to antagonize inflammation in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 59: 121-127.
- [23] LI L P, WANG R, LIANG W W, et al. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage in vitro[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 955-963.
- [24] ZHAN X, MA T, WU J, et al. Cloning and primary immunological study of TGF- $\beta$ 1 and its receptors T $\beta$ R I/T $\beta$ R II in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 134-140.
- [25] 张永德,林 勇,冯鹏霏,等. 尼罗罗非鱼 Lck 多克隆抗体的制备及鉴定[J]. *南方农业学报*, 2018(11): 2304-2310.
- [26] PAUKNER R, STAUDIGL P, CHOOSRI W, et al. Expression, purification, and characterization of galactose oxidase of *Fusarium sambucinum* in *E. coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 108: 73-79.
- [27] FERRER-MIRALLES N, SACCARDO P, CORCHERO J L, et al. General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins[M]. New York: Humana Press, 2015: 1-24.
- [28] LILIE H, SCHWARZ E, RUDOLPH R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9(5): 497-501.
- [29] SØRENSEN H P, MORTENSEN K K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(2): 113-128.
- [30] VILLAVERDE A, CORCHERO J L, SERAS-FRANZOSO J, et al. Functional protein aggregates: just the tip of the iceberg[J]. *Nanomedicine*, 2015, 10(18): 2881-2891.
- [31] CARRIO M, CUBARSI R, VILLAVERDE A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies[J]. *FEBS Letters*, 2000, 471(1): 7-11.
- [32] MITRAKI A, FANE B, HAASE-PETTINGELL C, et al. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation [J]. *Science*, 1991, 253(5015): 54-58.

(责任编辑:张震林)