

基于 I-FABP 的鲫肠道通透性检测方法的建立

王靖雯¹, 邹振江¹, 李莉娟^{1,2}, 顾泽茂^{1,2}, 袁军法^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学水生动物疫病专业实验室, 武汉 430070)

摘要: 肠道通透性与肠道稳态及个体健康状况直接相关, 目前尚缺乏鱼类肠道通透性的定量评价方法及试剂。血清中肠脂肪酸结合蛋白 (intestinal fatty acid binding protein, I-FABP) 是肠道通透性的重要血清生物学指标, 可用于肠道通透性的定量评价。为建立鲫 (*Carassius auratus*) 血清 I-FABP 的定量检测方法, 克隆了鲫 I-FABP 基因, 经原核表达和纯化, 并利用重组蛋白分别免疫新西兰白兔 (New Zealand white rabbit) 及小鼠 (*Mus musculus*), 制备了兔源及鼠源多克隆抗体, 其效价均为 1:80 000。以纯化的兔源多克隆抗体作为包被蛋白, 以辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的鼠源多克隆抗体作为酶标抗体, 通过优化各反应条件建立了基于鲫 I-FABP 的双抗体夹心酶联免疫检测方法 (double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA)。标准曲线的线性回归方程为 $y=0.0035x+0.0367$, 拟合度较高 R^2 为 0.9991, 临界值为 0.0906。批内及批间变异系数分别为 1.17%~5.50% 及 0.16%~4.78%, 具有较好的重复性。以该方法对 54 份样品进行检测, 与商业化试剂盒对比, 符合率为 100%。构建的 DAS-ELISA 检测方法可用于鲫肠道通透性的定量评估。鉴于鱼类 I-FABP 的保守性, 该方法或可用于其他鱼类肠道通透性的定量评价。

关键词: 肠脂肪酸结合蛋白; 肠道通透性; 双抗体夹心 ELISA; 原核表达; 多克隆抗体; 鲫

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2023)05-0809-08

DAS-ELISA method of detecting intestinal permeability based on I-FABP in crucian carp (*Carassius auratus*)

WANG Jingwen¹, ZOU Zhenjiang¹, LI Lijuan^{1,2}, GU Zema^{1,2}, YUAN Junfa^{1,2}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

2. National Aquatic Animal Diseases Para-reference Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Intestinal permeability is directly related to intestinal homeostasis and individual health. At present, there is a lack of quantitative evaluation methods and reagents for intestinal permeability of fish. Serum intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) is an important serum biological index for quantitative evaluation of intestinal permeability. In order to establish a quantitative detection method of serum I-FABP concentration in crucian carp (*Carassius auratus*), the I-FABP gene of crucian carp was cloned, expressed and purified in prokaryote. The rabbit and mouse polyclonal antibodies were prepared by immunizing New Zealand white rabbit and mouse with the recombinant protein, and their titers were 1:80 000. The rabbit polyclonal antibody was used as the coating protein, and the mouse polyclonal antibody labeled with HRP was used as the enzyme labeled antibody. By optimizing the reaction conditions, a double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) method based on rI-FABP was established. The linear regression equation of the standard curve was $y=0.0035x+0.0367$, the fitting degree was high, R^2 was 0.9991, and the cut-off value was 0.0906. The intra- and inter-assay coefficient of variation was 1.17%-5.50% and 0.16%-4.78% indicating the good repeatability of established DAS-ELISA. Compared with a commercial kit, the coincidence rate among 54 samples was 100%. The DAS-ELISA detection method constructed in this study can be used for the quantitative evaluation of the intestinal permeability of crucian carp. In view of the conservatism of fish I-FABP, this method may be used for quantitative evaluation of intestinal permeability of other fish.

Key words: intestinal fatty acid binding protein(I-FABP); intestinal permeability; double antibody sandwich ELISA(DAS-ELISA); prokaryotic expression; polyclonal antibody; crucian carp(*Carassius auratus*)

收稿日期: 2022-09-22

基金项目: 国家自然科学基金(32073013)资助。

作者简介: 王靖雯, 硕士研究生。E-mail: 953913796@qq.com

* 通信作者: 袁军法, 博士, 副教授。E-mail: jfyuan@mail.hzau.edu.cn

肠道是重要的消化吸收器官,兼具分泌、代谢和免疫等功能^[1]。肠黏膜受损、肠道通透性的增加与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)^[2]、克罗恩病(Crohn's disease, CD)^[3]等肠道疾病的发生、发展密切相关。因存在肠肝轴、肠肾轴、肠脑轴等多器官的交流,肠道的病变往往还会引起其他器官的损伤^[4],如酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)^[5]、慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)^[6]及抑郁症^[7]等疾病。在鱼类养殖中,肠道不仅被认为是鱼类弧菌病^[8]、肠道败血症^[9]等疾病的主要发生器官,还是食源性有毒物质的第一靶器官^[10]。除病原感染外,饲料内植物源成分(皂苷)的添加^[11]、真菌毒素的产生^[12]以及过度投喂等,都会造成鱼类肠道的炎症及损伤。因此,及时、准确的肠道健康状况评估是经济鱼类肠道疾病防控的关键环节。但目前,根据经验或采用组织学的方法对鱼类肠道健康进行评估,主观性强、操作复杂,尚缺乏有效的定量指标。

脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)是一类相对分子质量为14~16 kDa的可溶性小分子蛋白,广泛存在于心脏、脑、肠道等多种组织中^[13],与机体的能量贮存、信号传导和细胞的增殖分化等多种生命过程息息相关^[14]。肠型脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, I-FABP)是脂肪酸结合蛋白家族的一员,参与脂肪酸的扩散、运输与分解代谢,大量且特异性的表达于肠道黏膜细胞^[15]。通常情况下, I-FABP存在于细胞内,但当肠黏膜受损时, I-FABP将快速释放到循环系统中,导致血液、尿液中的 I-FABP水平显著升高^[16]。因此,血清 I-FABP指标可用于肠道通透性的定量检测。

I-FABP作为评估肠黏膜损伤和炎症的非侵入性生物标志物,具有特异性强、灵敏度高、稳定性好等特点^[17],已在医学中用于肠道损伤的早期检测^[13]。但目前尚无以鱼类 I-FABP为抗原设计并建立的肠道通透性检测方法。本实验通过制备重组鲫(*Carassius auratus*) I-FABP蛋白和多克隆兔抗、鼠抗,初步建立了 DAS-ELISA 检测方法,为鱼类肠道健康的评估以及疾病防治提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 试材与试剂

实验所用大肠杆菌表达载体 pET-32a 为本实验室保存,实验所用鲫血清样品采集自健康鲫或本实验室构建的肠损伤鲫模型。

2X M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR mix (with blue dye)、胶回收试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司; DNA Marker、Protein Marker、DH5 α 菌株、Rosetta (DE3) 菌株购自北京擎科新业生物技术有限公司;限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶配置试剂购自 Biosharp 公司; 酶标二抗 HRP-山羊抗兔 IgG(H+L)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 牛血清白蛋白(BSA)购自 Gibco 公司; ELISA 试验中 TMB 显色液和 TMB 显色终止液均购自上海碧云天生物技术有限公司; His 亲和层析柱、鼠抗 HRP 标记试剂盒(过碘酸盐法)、抗体纯化用 Protein A/G 琼脂糖纯化树脂和 ELISA 酶标板购自上海生工生物工程有限公司; 人 I-FABP 检测试剂盒(DAS-ELISA 法)购自上海羽朵生物科技有限公司; 引物合成与测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 鲫 I-FABP 的生物信息学分析 利用 NCBI 数据库(National Center for Biotechnology Information (nih.gov))获取鲫 *i-fabp* (NCBI Reference Sequence: XM_026204449.1)的 mRNA 序列及氨基酸序列,利用 SignalP5.0 在线软件(SignalP - 5.0 - Services - DTU Health Tech)进行氨基酸序列的信号肽预测;利用 TMHMM2.0 在线软件(TMHMM - 2.0 - Services - DTU Health Tech)进行跨膜区分析。利用 ESPrnt3.0 在线软件(ESPrnt 3.x / ENDscript 2.x (ibcp.fr))和 Megalign 软件对不同物种的 I-FABP 进行保守域预测及氨基酸相似度分析。参考氨基酸序列如下(NCBI Reference Sequence): XP_026060234.1(鲫), XP_018962588.1(鲤 *Cyprinus carpio*), AAF00925.1(斑马鱼 *Danio rerio*), AYP66989.1(泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus*), NP_001187833.1(斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus*), XP_014051032.1(大西洋鲑 *Salmo salar*), XP_021474749.1(虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*), AWP05540.1(大菱鲆 *Scophthalmus maximus*), EDL12315.1(小鼠 *Mus musculus*), EAW73666.1(人类 *Homo sapiens*)。

1.2.2 pET-32a-I-FABP 重组质粒的构建 根据鲫 *i-fabp* 的序列设计扩增引物,进行 PCR 扩增, *i-fabp* 片段扩增引物如下:正向引物, 5'-ATAGAATTCAT GACCTTCAACGGGACCTG-3';反向引物, 5'-CGC AAGCTTTTAGCTCCTCTTGAAAATCC-3',上下游引物的酶切位点以下划线表示。PCR 产物经 1.0%

的琼脂糖凝胶电泳检测有明亮单一条带后切胶回收。将纯化后的扩增产物与 pET-32a 载体进行双酶切处理。回收纯化后的启动子片段和载体按物质的量 3:1 混合, T4 DNA 连接酶 16℃连接 12 h, 转化入 DH5 α 感受态细胞, 涂布氨苄西林 (Amp) 抗性的平板, 37℃倒置培养 12 h。对单菌落进行菌液 PCR 检测及双酶切鉴定, 将阳性菌送测序, 验证序列是否正确。

1.2.3 鲫 I-FABP 的诱导表达及纯化 将测序比对结果正确的重组质粒, 转化入表达菌株 Rosetta (DE3) 中, 挑取单菌落接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中振荡过夜培养。次日取上述菌液按 1:100 的比例接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中, 培养至对数生长期后加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG) 至终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹, 转移至 16℃恒温培养箱中诱导表达 12 h。空载 pET-32a 采用同样的方法处理作对照。将诱导完全的菌液离心, 弃上清, 用 PBS 洗涤沉淀并将沉淀重悬。经高压破碎后在 4℃, 10 000 g 条件下离心为上清和沉淀。全液、上清和沉淀加入 SDS 上样缓冲液, 95℃变性 10 min, SDS-PAGE 检测其表达情况和可溶性。使用 0.45 μ m 的滤器过滤上述所得上清样品, 并按 Ni-NTA 预装重力柱(货号: C600791-0005)说明中的重力法组氨酸标签蛋白纯化步骤纯化重组标签蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测纯化所得蛋白的纯度。

1.2.4 抗体的制备与检测 将纯化所得的可溶性蛋白免疫实验用兔及实验用鼠。实验用兔每只每次免疫 600~800 μ g 蛋白, 免疫 3 次后从颈动脉放血, 分离血清。实验用鼠每次按 50~100 μ g·只⁻¹ 的剂量进行免疫, 4 次免疫后眼眶取血获得鼠源抗血清。利用 Protein A/G 4FF 预装重力柱(货号: C600981-0005)的操作说明分别纯化兔源及鼠源抗血清, SDS-PAGE 检测纯化效果。将表达的重组蛋白用 PBS 重悬后进行 SDS-PAGE 电泳, 兔源多克隆抗体按 1:20 000、1:40 000 和 1:80 000 的比例稀释作为一抗, AP 标记的羊抗兔抗体按 1:10 000 稀释作为二抗, 进行 Western-Blot 检测。按照 HRP 偶联试剂盒(货号: D601047-0001)的操作步骤对纯化后的鼠源多克隆抗体进行标记, 利用直接 ELISA 方法检测纯化且标记后的鼠源抗体效价。

1.2.5 最佳工作浓度的测定 兔多抗按 1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000 和 1:80 000 进行倍比稀释加入酶标板中, 100 μ L·孔⁻¹, 4℃过夜包被。37℃封闭 2 h 后加入 I-FABP (用

PBS-T 以 1:5 000 稀释)和阴性对照 (PBS-T), 100 μ L·孔⁻¹, 37℃孵育 1 h。将 HRP 标记的鼠多抗按 1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:20 000 和 1:40 000 进行倍比稀释, 100 μ L·孔⁻¹, 37℃孵育 40~60 min。经避光显色后加入 ELISA 终止液, 利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值并进行分析, 计算 P/N 值, 取 P/N 最高值时的抗体工作浓度为兔抗及鼠抗最佳工作浓度。

1.2.6 最佳工作条件的选择 利用 DAS-ELISA 法, 按已确定的包被浓度对酶标板进行包被和封闭, 包被条件分别设为 4℃ 2 h、4℃ 24 h、37℃ 1 h、37℃ 2 h 和 25℃ (室温) 2 h。利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值并计算 P/N 值, 以确定最佳包被条件。

以最佳抗原包被浓度和包被条件包被酶标板, 酶标抗体分别在 4℃ 2 h、4℃ 24 h、37℃ 15 min、37℃ 30 min 和 37℃ 60 min 的条件下孵育, 利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值并计算 P/N 值, 以确定最佳反应条件。

1.2.7 标准曲线的构建 按 0、50、100、200、400 和 800 pg·mL⁻¹ 的浓度稀释 I-FABP 蛋白作为待检测标准品, 按上述优化条件对标准品进行测定, 读取 OD₄₅₀ 值, 构建标准曲线。

1.2.8 临界 (CUT-OFF) 值的确定 使用此方法检测 36 个健康鲫样品的 OD₄₅₀ 值, 计算 OD₄₅₀ 的平均值 (\bar{x}) 和标准差 (SD), OD₄₅₀ 值 \geq 平均值+3 倍标准差时判定为阳性, OD₄₅₀ 值 \leq 平均值+3 倍标准差时判为阴性, 即 CUT-OFF 值为 $\bar{x}+3SD$ 。

1.2.9 重复性及符合率检测 进行批间重复试验, 按照已确定的最佳包被浓度及包被条件, 对不同批次酶标板进行包被, 按已构建的方法分别对已知阴性和阳性样品进行检测, 通过测定的 OD₄₅₀ 值计算变异系数。

进行批内重复试验, 用同一批次包被的酶标板分别对已知阴性和阳性样品分别进行 3 次重复实验, 通过测定的 OD₄₅₀ 值计算变异系数。

使用商业化检测试剂盒与本实验构建的 I-FABP 双抗体夹心 ELISA 检测方法分别对 54 份样本进行检测, 比较这两种抗原检测方法的符合率情况, 对构建的 ELISA 检测方法的符合率进行评估。

1.2.10 统计分析 所有实验数据均采用双样本等方差 *t* 检验进行处理, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 或 ***, $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 鲫 *i-fabp* 基因的序列分析与克隆

I-FABP 在不同物种中较为保守, 氨基酸序列中

存在多处保守位点(图 1A)。鲫 *i-fabp* 长 399 bp, 编码 133 个氨基酸, 与人和小鼠的相似度较高, 均为 67.4%。鲫 *i-fabp* 与其他鱼类的相似度更高, 达 80.3%~97% (图 1B)。对目的基因鲫 *i-fabp* 的全长

进行扩增, 其片段大小与预期一致(图 2A)。将扩增的鲫 *i-fabp* 基因克隆至 pET-32a 载体, 经双酶切鉴定可见两条与载体及目的基因大小一致的特异性条带, 成功获得 pET-32a-I-FABP 重组质粒(图 2B)。

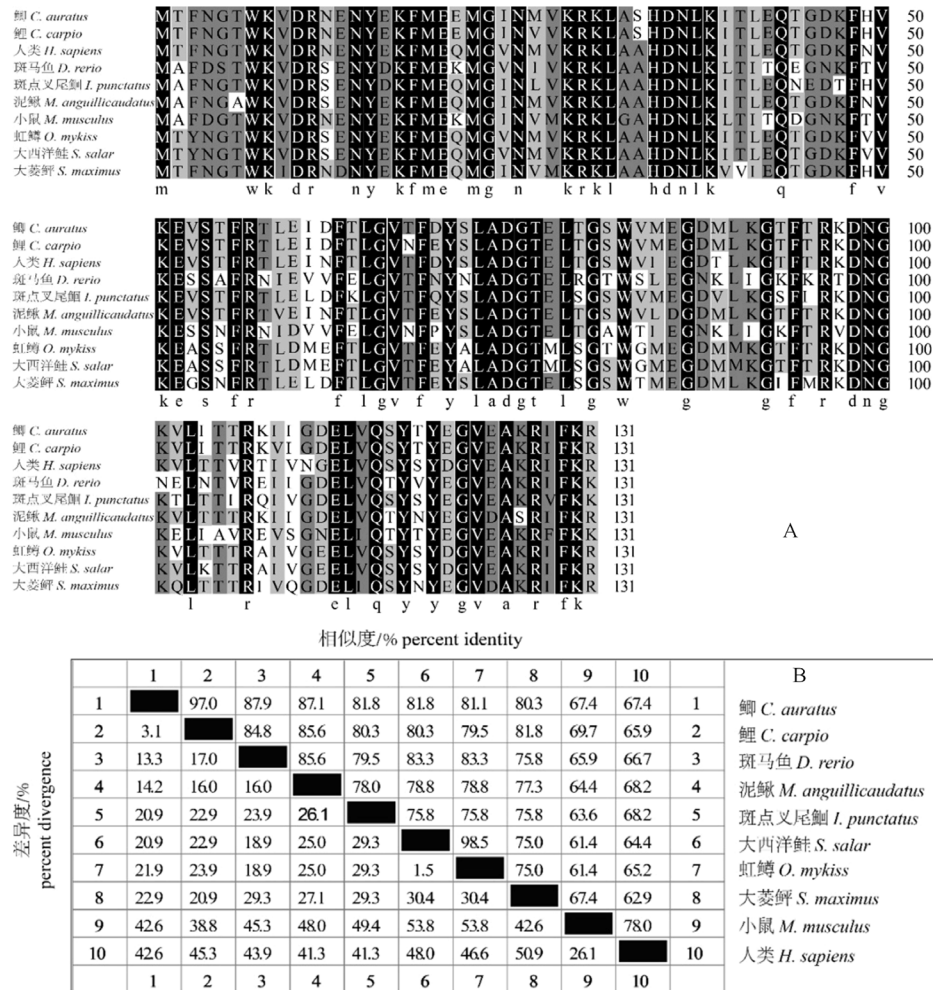
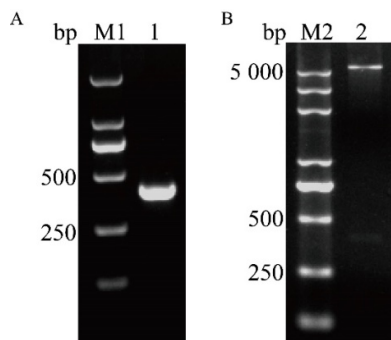


图 1 不同物种 I-FABP 的氨基酸序列比对 (A) 及相似度分析 (B)

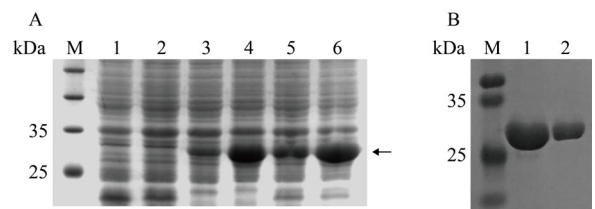
Figure 1 Amino acid sequence alignment (A) and similarity analysis (B) of I-FABP of different species



A. M1.分子质量标准 DL2 000; 1. *i-fabp* 基因扩增

B. M2.分子质量标准 DL5 000; 2. 重组质粒 pET-32a-I-FABP 双酶切鉴定 (*EcoR* I 和 *Hind* III)

图 2 *i-fabp* 的扩增及 pET-32a-I-FABP 重组质粒的双酶切鉴定
Figure 2 Amplification of *i-fabp* and identification of the recombinant plasmid pET-32a-I-FABP



A. SDS-PAGE 分析 pET-32a-I-FABP 在 16 °C 下的表达, M. 预染标准分子量蛋白; 1. 不加入 IPTG 的空载对照组; 2. 加入 IPTG 的空载对照组; 3. 不加入 IPTG 的重组对照组; 4. 加入 IPTG 全菌蛋白实验组; 5. 实验组的沉淀; 6. 实验组的上清; 箭头指示表达的蛋白条带

B. pET-32a-I-FABP 融合蛋白的纯化, M. 预染标准分子量蛋白; 1~2. 上清液纯化

图 3 pET-32a-I-FABP 的诱导表达及 I-FABP 的纯化
Figure 3 Induced expression of pET-32a-I-FABP and purification of I-FABP

2.2 I-FABP 的原核表达及纯化

将上述构建所得的重组质粒转化入表达菌株 Rosetta (DE3), 并诱导表达。与空载组和未诱导组相比, 经诱导的 pET- 32a-I-FABP 重组质粒在 32 kDa 处出现明显的蛋白条带, 可溶性分析显示该融合蛋白大多存在于上清中, 呈可溶性表达 (图 3A)。利用 His 层析柱对该可溶性蛋白进行亲和纯化, SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示, 目的蛋白条带明亮且单一, 获得纯度及浓度均较高的重组融合蛋白(图 3B)。

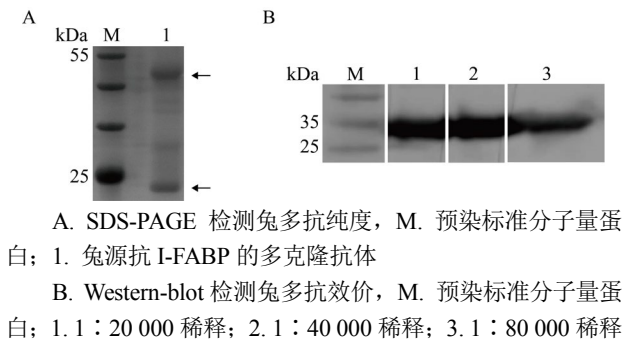


图 4 I-FABP 兔多抗的纯化及效价检测

Figure 4 Purification and titer detection of I-FABP rabbit polyclonal antibody

2.3 抗体的纯化及效价检测

以上述纯化后的重组蛋白免疫实验用兔, 抗血清经 Protein A/G 层析柱亲和纯化, SDS-PAGE 分析可见明确、清晰的条带, 即获得了较为纯净的兔源

多克隆抗体 (图 4A)。以兔多抗为一抗, 商业化抗体羊抗兔为二抗, 检测制备所得兔多抗的效价。结果显示(图 4B), 本实验制备的兔多抗在 1 : 20 000 ~ 1 : 80 000 的稀释倍数下均有清晰的免疫印迹, 表明该兔源 I-FABP 多克隆抗体具有高效价。

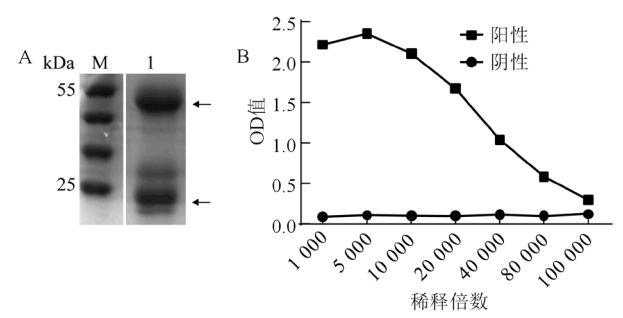


图 5 I-FABP 鼠多抗的纯化及效价检测

Figure 5 Purification and titer detection of I-FABP mouse polyclonal antibody

以纯化的重组蛋白免疫实验用鼠, 抗血清经 Protein A/G 层析柱亲和纯化, 获得较为纯净的鼠源 I-FABP 多克隆抗体 (图 5A)。以 ELISA 法测定经 HRP 标记后的鼠抗效价,(图 5B), 当稀释倍数为 1 : 80 000 时, 鼠抗仍具有反应性, 表明本实验制备的鼠源 I-FABP 多克隆抗体效价为 1 : 80 000。

表 1 包被抗体与酶标抗体最佳工作浓度的确定

Table 1 Determination of optimum working concentration of coated antibody and enzyme-conjugated antibody (P/N value)

酶标抗体的稀释倍数	包被抗体的稀释倍数				
	1 : 1 000	1 : 5 000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 40 000
1:1 000	32.625 3	28.037 1	27.277 0	23.239 1	20.994 7
1:5 000	21.010 6	25.349 8	29.622 7	19.174 4	12.078 5
1:10 000	16.985 9	15.097 6	16.792 5	8.731 6	4.882 4
1:20 000	9.376 4	8.586 0	8.981 4	5.473 8	4.612 1
1:40 000	6.995 8	7.670 1	6.500 7	4.181 1	4.458 7

2.4 最佳包被浓度及工作浓度的筛选

使用 DAS-ELISA 检测法和棋盘法确定包被抗体 (兔源 I-FABP 多克隆抗体) 及酶标抗体 (鼠源 I-FABP 多克隆抗体) 的最佳工作浓度。结果如表 1 所示, 当两种抗体的稀释倍数均为 1 : 1 000 时, P/N 值最大 (32.625 3), 抗体反应性最好, 但此时抗体利用率较低。综合 P/N 值及抗体利用率, 认为 P/N 值为 29.622 7 时的稀释倍数为最佳, 此时包被抗体及酶标抗体的稀释倍数分别为 1 : 10 000 和 1:5 000。

2.5 包被条件及抗体反应条件的确定

在包被条件及抗体反应条件的筛选中, 不同温度、时间处理下抗体的反应性不同 (图 6)。当兔抗

作为包被蛋白, 4 ℃ 下包被 24 h 时, OD 值与 P/N 值最高, 反应性最好, 故选择 4 ℃ 24 h 作为最佳包被条件 (图 6 (a))。而鼠抗作为酶标抗体, 与抗原抗体复合物在 37 ℃, 反应 30~60 min 时, OD 值与 P/N 值均较高, 均具有较好的反应性, 故酶标抗体的最佳反应条件为 37 ℃, 30 ~60 min (图 6 (b))。

2.6 标准曲线的构建

基于上述工作条件的优化, 建立 DAS-ELISA 检测方法, 并利用该方法对已知浓度的 I-FABP 标准品进行检测, 获得 $y=0.003 5x+0.036 7$, $R^2>0.999$ 的标准曲线 (图 7)。

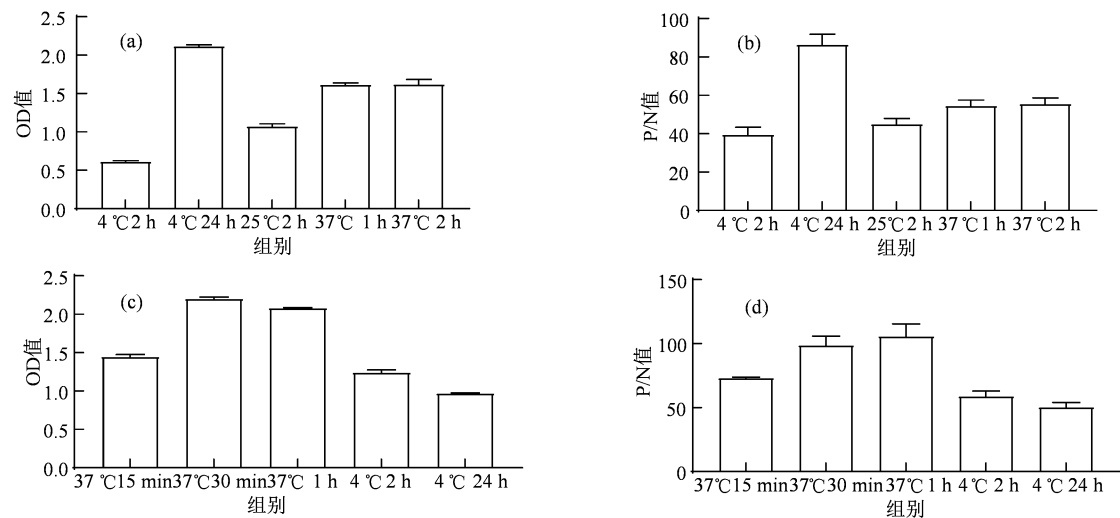


图 6 最佳包被条件 (a) 及抗体反应条件 (b) 的确定
Figure 6 Determination of coating conditions (a) and antibody reaction conditions (b)

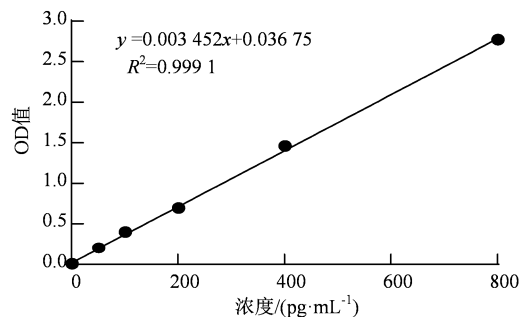


图 7 基于 DAS-ELISA 的 I-FABP 标准曲线
Figure 7 Standard curve of I-FABP based on DAS-ELISA

2.7 临界 (CUT-OFF) 值的确定

为确定检测样品阴、阳性的临界值, 本实验利用 DAS-ELISA 检测方法, 对 36 份健康鲫样品进行检测, 经计算可得, 健康鲫样品的平均 OD 值为

0.065 1, 标准差为 0.008 5, 即临界值 CUT-OFF=0.090 6。

2.8 重复性及符合率检验

为检测基于 DAS-ELISA 检测方法检测所得结果的重复性, 本实验对部分已知样品进行了检测。研究结果显示 (表 2), 肠损伤模型鲫样品的批内变异系数为 1.17%~3.82%, 批间变异系数为 0.16%~4.55%; 健康鲫样品的批内变异系数为 1.84%~5.50%, 批间变异系数为 2.70%~4.78%。所有检测结果的变异系数均远小于 15%, 表明该 DAS-ELISA 方法的检测结果重复性良好。符合率检验的结果显示 (表 3), DAS-ELISA 检测法共检 18 例样品高于临界值, 而 36 份样品低于临界值与商业化试剂盒检出结果一致, 检验符合率为 100%。

表 2 重复性检验结果
Table 2 Results of repeatability test

		批内变异系数		批间变异系数		
		均值±标准差	变异系数	均值±标准差	变异系数	
		$\bar{x} \pm SD$	CV/%	$\bar{x} \pm SD$	CV/%	
阳性样品	批次 1	0.721±0.008	1.17	批间	0.710±0.017	2.40
		0.648±0.015	2.32		0.627±0.028	4.55
		0.721±0.024	3.36			
	批次 2	0.697±0.027	3.82	0.720±0.001	0.16	
		0.607±0.016	2.58			
		0.719±0.010	1.40			
阴性样品	批次 1	0.061±0.003	5.13	批间	0.059±0.002	4.78
		0.055±0.001	2.35		0.054±0.001	2.70
		0.063±0.003	5.50			
	批次 2	0.058±0.001	1.84	0.061±0.002	3.34	
		0.053±0.001	2.14			
		0.060±0.020	2.80			

表 3 符合率检验结果
Table 3 Coincidence rate test results

		商业化试剂盒		符合率/%
		阳性 (份)	阴性 (份)	
双抗体夹心法 DAS-ELISA	阴性检出数 (份)	0	36	100
	阳性检出数 (份)	18	0	100
	总样品数 (份)	54		100

3 讨论与结论

肠道是鱼类病原体入侵的主要途径之一^[18]。病原体可以影响肠道屏障完整性,诱导炎症反应,促进肠黏膜上皮细胞的损伤和凋亡^[19]。迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)^[20]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[21]等引起的细菌性肠炎是养殖鱼类最常见的肠道疾病。嗜水气单胞菌感染可损害草鱼肠道黏膜屏障的结构和功能,出现炎症细胞浸润、黏膜下层水肿等现象^[22]。大西洋鲑在感染传染性胰腺坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 后,肠道屏障通透性显著升高^[23]。肠道通透性的增加还进一步增强了肠道对病原体的易感性,从而促进致病菌通过肠道屏障进行易位^[24]。因此,肠道通透性在维持肠道正常生理功能和机体稳态方面发挥重要作用,对鱼类肠道通透性和肠道健康状况的评估将有助于疾病的防控。

目前用于评估肠道通透性的方法主要有基于光镜和电镜的组织学检测、基于分子生物学的紧密连接蛋白的表达分析以及基于血液、尿液及粪便的生物标志物检测^[25]。相较于其他检测方法,乳果糖、甘露醇及 I-FABP 等生物标志物的检测方法取样方便,测定方法也更为快捷,应用广泛^[26]。

I-FABP 分子量低、稳定性强、组织特异性高,参与脂肪酸的转运与代谢。除调节糖、脂代谢外,I-FABP 还与代谢性、炎症性疾病相关。先前多数临床研究集中于 I-FABP 作为急性肠损伤的诊断标志上。近来研究显示,I-FABP 对慢性肠道疾病也具有指示作用。此外,I-FABP 的高亲和力及转运特性也为亲脂性药物的溶解及运输提供了便利,为药物的开发及慢性代谢性疾病的治疗提供了新的思路^[27]。目前,I-FABP 已应用于坏死性小肠结肠炎,肠系膜梗死和溃疡性结肠炎等疾病的预前检测^[28]。研究发现,I-FABP 可以在艾滋病病毒感染造成的胃肠道炎症和肠黏膜损伤检测中发挥指示作用^[15],鸡 I-FABP 也可作为由球虫病引起的鸡肠道病变的生物标志物,因此 I-FABP 还是评估病原感染造成的肠道损伤的重要指标^[13]。

本实验利用原核表达制备了可溶性 I-FABP 重组蛋白及多克隆抗体,通过优化包被浓度、反应时间等建立了 DAS-ELISA 无损检测方法,具有良好的重复性,可用于鲫 I-FABP 的定量检测。鉴于 I-FABP 已在多种鱼类中被鉴定^[29],如鲫、鲤、大西洋鲑、斑马鱼^[30]、虹鳟^[31],其氨基酸序列相似度高达 80.3%以上,提示基于鲫 I-FABP 构建的检测方法或适用于其他鱼类的 I-FABP 检测,为鱼类肠道通透性和肠道健康状况的评估提供了方法及工具。

参考文献:

[1] PETERSON L W, ARTIS D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(3): 141-153.

[2] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.

[3] TORRES J, MEHANDRU S, COLOMBEL J F, et al. Crohn's disease[J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1741-1755.

[4] 翟少伟, 史庆超, 陈学豪. 饲料中添加抗菌肽 Surfactin 对吉富罗非鱼肠道健康的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 823-829.

[5] SZABO G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease[J]. Gastroenterology, 2015, 148(1): 30-36.

[6] VAZIRI N D, ZHAO Y Y, Pahl M V. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment[J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(5): 737-746.

[7] WU Y D, MURRAY G K, BYRNE E M, et al. GWAS of peptic ulcer disease implicates *Helicobacter pylori* infection, other gastrointestinal disorders and depression[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1146.

[8] MACPHERSON H L, BERGH Ø, BIRKBECK T H. An aerolysin-like enterotoxin from *Vibrio splendidus* may be involved in intestinal tract damage and mortalities in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and cod, *Gadus morhua* L., larvae[J]. J Fish Dis, 2012, 35(2): 153-167.

[9] ABDELHAMED H, LAWRENCE M L, KARSİ A. Development and characterization of a novel live attenuated vaccine against enteric septicemia of catfish[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1819.

[10] BOUHET S, OSWALD I P. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity[J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(8): 925-931.

- [11] VASANTH G, KIRON V, KULKARNI A, et al. A microbial feed additive abates intestinal inflammation in Atlantic salmon[J]. Front Immunol, 2015, 6: 409.
- [12] LIU X, WU P, JIANG W D, et al. Effects of dietary ochratoxin A on growth performance and intestinal apical junctional complex of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Toxins, 2020, 13(1): 11.
- [13] CAHYANINGSIH U, SATYANINGTIJAS A S, TARIGAN R, et al. Chicken I-FABP as biomarker of chicken intestinal lesion caused by coccidiosis[J]. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci, 2018, 196: 012032.
- [14] VEERKAMP J H, PAULUSSEN R J, PEETERS R A, et al. Detection, tissue distribution and (sub)cellular localization of fatty acid-binding protein types[J]. Mol Cell Biochem, 1990, 98: 11-18.
- [15] SKOWYRA A, MIKUŁA T, SUCHACZ M, et al. The role of serum I-FABP concentration in assessment of small intestine mucosa among HIV-infected patients[J]. Eur J Inflamm, 2015, 13(2): 75-81.
- [16] COELHO A M M, SAMPIETRE S, MACHADO M C, et al. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) is a marker of bacterial translocation in experimental acute pancreatitis[J]. HPB, 2016, 18(S1): e333.
- [17] LAU E, MARQUES C, PESTANA D, et al. The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity[J]. Nutr Metab, 2016, 13: 31.
- [18] ZHANG X J, YANG W M, ZHANG D F, et al. Does the gastrointestinal tract serve as the infectious route of *Aeromonas hydrophila* in crucian carp (*Carassius carassius*)?[J]. Aquac Res, 2015, 46(1): 141-154.
- [19] GROSCWITZ K R, HOGAN S P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(1): 3-20.
- [20] LIU X, CHANG X, WU H, et al. Role of intestinal inflammation in predisposition of *Edwardsiella tarda* infection in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 41(2): 271-278.
- [21] SONG X, ZHAO J, BO Y, et al. *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): An experimental model[J]. Aquaculture, 2014, 434: 171-178.
- [22] KONG W G, LI S S, CHEN X X, et al. A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish Physiol Biochem, 2017, 43(5): 1223-1235.
- [23] SUNDH H, OLSEN R E, FRIDELL F, et al. The effect of hyperoxygenation and reduced flow in fresh water and subsequent infectious pancreatic necrosis virus challenge in sea water, on the intestinal barrier integrity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. J Fish Dis, 2009, 32(8): 687-698.
- [24] JUTFELT F, SUNDH H, GLETTE J, et al. The involvement of *Aeromonas salmonicida* virulence factors in bacterial translocation across the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), intestine[J]. J Fish Dis, 2008, 31(2): 141-151.
- [25] VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 11(9): 821-834.
- [26] 高鹏, 张旭光, 刘雪来. 肠道黏膜屏障功能评估的研究进展[J]. 发育医学电子杂志, 2019, 7(1): 70-74.
- [27] HUANG X, ZHOU Y, SUN Y, et al. Intestinal fatty acid binding protein: A rising therapeutic target in lipid metabolism[J]. Prog Lipid Res, 2022, 87: 101178.
- [28] VOTH M, LUSTENBERGER T, RELJA B, et al. Is I-FABP not only a marker for the detection abdominal injury but also of hemorrhagic shock in severely injured trauma patients?[J]. World J Emerg Surg, 2019, 14(1): 1-9.
- [29] 隋修磊, 张玉茹. 鱼类脂肪酸结合蛋白研究进展[J]. 水产科学, 2019, 38(4): 563-574.
- [30] ZHANG W, ZHANG Y T, ZHANG H X, et al. Sex differences in transcriptional expression of FABPs in zebrafish liver after chronic perfluorononanoic acid exposure[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(9): 5175-5182.
- [31] BAYIR M, BAYIR A, WRIGHT J M. Divergent spatial regulation of duplicated fatty acid-binding protein (fabp) genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comp Biochem Physiol D Genom Proteom, 2015, 14: 26-32.