

鲤鱼 IL8 的克隆及序列分析*

李莲瑞^{1,2}, 卢强^{2**}, 刘明远², 崔国祯², 韩文瑜²

(1. 新疆塔里木大学动物科技学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 吉林大学人兽共患病研究所, 吉林长春 130062)

摘要: 利用 DD-RT-PCR (正常鲤鱼外周血白细胞和经有丝分裂原刺激后白细胞的总 RNA) 获得的差异显示片段 B₁₀ 克隆 (编码 IL8 的一段序列), 对该基因进行 DIG 标记, 对有丝分裂原刺激的鲤鱼外周血白细胞 cDNA 文库进行核酸杂交筛选, 从 0.8×10^4 个重组噬菌体中, 经过 2 轮筛选最终获得阳性克隆, 挑选了 3 个分别命名为 IL8-1, IL8-2, IL8-3。测序后经 NCBI Blast 分析表明, 阳性克隆具有完整阅读框架, 均为编码鲤鱼 IL8 的全长 cDNA, 编码的多肽由 98 个氨基酸残基组成, 其相对分子质量理论推导值为 10 848.9 Da, 等电点为 8.68。且与 2003 年 12 月 Dev Comp Immunol. 杂志报道的荷兰鲤鱼氨基酸的同源性达 84%。

关键词: 鲤鱼; IL8; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q 959.468 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2008) 01-0068-05

Cloning IL8 Gene of Carp and Squence Analysis

LI Lian-rui^{1,2}, LU Qiang¹, LIU Ming-yuan², CUI Gou-zhen², HAN Wen-yu²

(1. Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production and Construction Group, Alar 843300, China; 2. Insitute of Zoonoses, Jilin Univerinary, Changchun 130062, China)

Abstract: In order to study immune related genes in carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes, cDNAs (termed IL8) were cloned from the cDNA library of mitogen stimulated carp leucocytes by a probe gotten from the DD-RT-PCR. IL8-1, IL8-2 and IL8-3 cDNA respectively were 729bp, 753bp and 730bp in full length with an ORF of 294bp encoding IL8 gene. Those genes all encoded 98 amino acids with molecular weight of 10848.9Da and isoelectric point of 8.68. Blast searching revealed that there were significant homologues with interleukin-8 gene in carp leucocytes in Netherlands (reported in Dev Comp Immunol.) amount to 84%.

Key words: Carp (*Cyprinus carpio* L.); interleukin-8 gene; Cloning; sequence analysis

IL8 是一种多源性的细胞因子, 是一种中性粒细胞的趋化因子。IL-1、TNF、内毒素、病毒转移和 PHA 均能诱导单核细胞、巨噬细胞^[1]、成纤维细胞^[2]、内皮细胞^[3]合成和分泌 IL8。本试验通过 DD-RT-PCR 获得的 B10 克隆 (编码 IL8 的一段序列), 对该基因进行 DIG 标记, 筛选有丝分裂原刺激鲤鱼外周血白细胞的 cDNA 文库^[4], 获得的阳性克隆经 FindMod 分析, 该 ORF 编码的蛋白质由 98 个氨基酸残基组成, 其相对分子质量理论推导值为 10 848.9 Da, 等电点为 8.68, 负电

荷氨基酸残基有 11 个, 正电荷的氨基酸残基有 14 个。经序列分析证实, 笔者获得了 IL8 全长 cDNA, 证实鲤鱼 IL8 基因经有丝分裂原 PHA 和 LPS 刺激后, 在鲤鱼白细胞中进行了表达。笔者在国内首次获得了鲤鱼 IL8 基因的全长 cDNA 克隆, 为阐明鲤鱼 IL8 在免疫和炎症过程中的调节作用, 进一步研究鲤 IL8 对抗原的识别与杀伤以及其对中性粒细胞的趋化和诱导脱粒作用奠定基础。

收稿日期: 2006-11-27 修回日期: 2007-04-25

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200210)

** 通讯作者

作者简介: 李莲瑞 (1968-), 女, 博士, 副教授, 主要从事微生物学与免疫学研究。E-mail: lilianrui51@163.com

1 材料与方法

1.1 试验动物

取自水库的体重 500 ~ 750 g 的鲤鱼, 在水族箱内充气暂养, 正常饲喂。

1.2 主要试剂和材料

地高辛试剂盒 (TAKARA 公司), Hybond - N + 尼龙膜 (Amersham 公司)。

1.3 有丝分裂原刺激的鲤鱼外周血白细胞 cDNA 文库的构建

见文献 [4]

1.4 正常鲤鱼外周血白细胞 cDNA 文库的构建

见文献 [5]

1.5 鲤鱼 IL8 基因探针的制备及标记

以 B10 克隆菌为模板, 利用 M13 引物 (AGCGGATAACAATTTCACACAGGA) 及 T7 引物 (GTAATACGACTCACTATAGGGC) 扩增 IL8 的探针 cDNA 片段。PCR 扩增后切胶回收 DNA 片段。然后对 DNA 片段进行 DIG 标记。使模板 DNA 片段 (0.1 ~ 3 μg) 至总体积 15 μL, 沸水浴变性 10 min, 迅速冰浴冷却 5 min。在冰浴中加入 2 mL 六聚核苷酸混合物、2 mL dNTP 混合物、1 mL Klenow 酶, 然后混匀离心数秒, 37 °C 孵育 20 h。取出后加入 2 mL 0.2 mol/L EDTA (pH 8.0) 终止反应。加入 2.5 mL 4 mol/L LiCl 和 75 mL -20 °C 预冷无水乙醇, 充分混匀后, -20 °C 放置过夜后, 4 °C 12 000 g 离心 30 min, 用 50 mL -20 °C 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀, 再 12 000 g 离心 30 min, 干燥 DNA 后溶于 50 mL TE 缓冲液。

1.6 IL8 全长 cDNA 的筛选

1.6.1 杂交膜的制备与杂交

取 0.8×10^4 pfu 有丝分裂原刺激的鲤鱼外周血白细胞 cDNA 文库加入 600 μL 宿主菌 XL₁ - Blue (OD₆₀₀ = 0.5) 中, 37 °C 孵育 15 min 后加入到 7.0 mL, 50 °C 的 NZY TOP 中混匀后迅速铺于 NZY Agar 平板, 37 °C 培养 6 ~ 8 h, 转移至尼龙膜, 待膜干燥后经变性、中和、洗涤、干燥后交联。将尼龙膜置于杂接管中, 68 °C 杂交 16 h。

1.6.2 洗膜、检测、显色

在室温下将杂交后的尼龙膜, 用足量的 2 × SSC, 0.1% SDS 洗液洗 2 × 15 min, 再用 0.1 × SSC, 0.1% SDS 于 68 °C 洗 2 × 15 min。然后将尼龙膜从杂接管中取出, 用充足的马来酸洗液室温

下洗膜 5 min, 将尼龙膜放入封闭液中孵育 30 min, 将膜放在 anti - DIG - AP 复合物溶液中孵育 30 min, 然后用足量的马来酸洗液洗膜 2 次, 每次 15 min。再将尼龙膜放入 AP 检测液中平衡 3 min 后, 放入显色液中显色过夜后观察结果。

1.6.3 阳性克隆的筛选

从琼脂平板上挑出阳性斑于含有 20 μL 氯仿的 500 μL SM 缓冲液中, 然后取出 100 μL 作 1:100 稀释, 取其 3 μL (约 100 pfu) 加入 200 μL XL₁ - Blue (OD₆₀₀ = 0.5) 中, 37 °C 孵育 15 min 后, 加入 3 mL 50 °C 预热的 NZY TOP 中并铺板, 37 °C 培养 8 ~ 10 h。继续第二轮杂交筛选, 最后挑选出阳性噬菌斑于含有 20 μL 氯仿的 500 μL SM 缓冲液中, 室温 2 h 或 4 °C 过夜。

1.6.4 噬菌粒的切割

取阳性克隆噬菌体 1.0×10^5 pfu 加入到 200 μL XL₁ - Blue (OD₆₀₀ = 1) 中, 并加入 1 μL ExAssist helper phage ($>1.0 \times 10^6$ pfu/μL) 37 °C 孵育 15 min 后, 加入 3 mL NZY 液体培养基中培养 8 h, 取出于 68 °C 水浴锅中灭活 20 min 后, 1 000 g 离心 15 min, 收集上清, 即为噬菌粒。

1.6.5 序列测定及分析

将提取的噬菌粒转入宿主菌 XL₁LR (OD₆₀₀ = 1) 培养, 将样品送测序, 并利用 ExPASy tools 和 NCBI Blast 对筛选到的阳性克隆进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增探针序列的结果

由图 1 可知, 探针片段大小为 230 bp 左右。

2.2 DIG 探针筛选的一轮阳性斑和二轮阳性斑结果见图 2。

2.3 阳性克隆编码的 IL8 功能结构域分析

经 NCBI Blast 分析显示 IL8 - 1, IL8 - 2, IL8 - 3 基因均编码鲤鱼 IL8, 含有 IL8 的功能结构域, 见图 3。

2.4 阳性克隆的同源性分析

将 IL8 - 1, IL8 - 2, IL8 - 3 经 ExPASy tools 分析, 阳性克隆 cDNA 编码的氨基酸序列与已报道的荷兰鲤鱼的 IL8 的同源性达 84%, 而 IL8 - 1, IL8 - 2, IL8 - 3 的氨基酸残基序列的同源性达 100%。均编码 98 个氨基酸。阳性克隆 cDNA 编码的氨基酸序列与荷兰鲤鱼编码的氨基酸残基序列的同源性比较见图 4。

-螺旋占 30.61%,直链占 22.45%,无规卷曲占 39.8%;该基因编码的 IPR001811 家族氨基酸序列其 α -螺旋占 38.78%,直链占 18.37%,无规卷曲占 42.86%;该基因编码的 IPR0002473 家族的氨基酸序列其 α -螺旋占 9.18%,直链占 39.8%,无规卷曲占 51.02%。

3 讨论

1986 年 KOWNAZKI 首先证实单核细胞可产生一种中性粒细胞趋化因子。1987 年由 YASHIMMA 以脂多糖 (LPS)、植物凝集素 (PHA) 刺激人单核细胞,培养上清经纯化证实对中性粒细胞有趋化作用^[6]。此后,多个实验室相继发现有同样活性的细胞因子,并根据这些因子的不同生物活性,给以不同的命名,如中性粒细胞激活蛋白-1、单核细胞衍生的中性粒细胞趋化因子、单核细胞衍生的中性粒细胞激活肽、中性粒细胞激活因子、淋巴细胞衍生的中性粒细胞趋化因子。白细胞介素为在白细胞之间传递免疫调节信息的生物分子,是免疫学中最庞大、最重要的一类细胞因子。IL8 的细胞来源主要是单核细胞、组织巨噬细胞。PHA 等丝分裂源活化的 T 细胞也可产生 IL8。人类多种肿瘤细胞均可产生 IL8^[6]。其中甲状腺癌、鳞状细胞癌、肝癌、肾细胞癌等需在 IL-1 或 INF-a 等刺激下合成和分泌 IL8。1988 年 MATSUSHIMO 首次获得 IL8 cDNA^[7] 克隆,并在大肠杆菌和中国仓鼠母细胞表达成功。同年, LINDEY 亦成功地在大肠杆菌内获得 IL8 的产物,实现 IL8 基因重组。在中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T 淋巴细胞、单核细胞表面均有 IL8 受体^[6]。

HUSING MO 等在 *Dev Comp Immunol* 杂志报道了一个新的鲤鱼 IL8, IL8 表达量最高的组织是与免疫有关的头肾和脾。此外,他们认为 PMA 刺激了 4 h 后,明显提高了头肾巨噬细胞 IL8 的表达,而 LPS 刺激不具此作用。他们确认 IL8 介导硬骨鱼类嗜中性粒细胞的趋化。鲤鱼的 IL8 和哺乳动物的 IL8 对嗜中性粒细胞有相同的趋化作用^[8]。哺乳动物的 IL8 家族具有促有丝分裂、趋化和促使炎症反应的作用,他们被巨噬细胞、间叶细胞、和许多组织细胞释放,暴露于炎症表面。该因子诱导血液中的嗜中性白细胞聚集于炎症细胞的表面,是机体的一种防御伤害和感染的反应^[9,10]。

笔者通过 DD-RT-PCR 获得的部分 IL8 基因的 DIG 探针筛选有丝分裂原刺激鲤鱼外周血白细胞的 cDNA 文库^[4],获得的阳性克隆经 ExPASY tools 中分析,该基因 ORF 编码的蛋白质由 98 个氨基酸残基组成,与荷兰鲤鱼同源性达 84%。序列分析证实,笔者获得了 IL8 全长 cDNA,说明 IL8 基因经有丝分裂原 PHA 和 LPS 刺激后,能在鲤鱼白细胞中表达。笔者在国内首次获得了鲤鱼 IL8 基因的全长 cDNA 克隆,为阐明鲤鱼 IL8 在免疫和炎症过程中的调节作用,进一步研究鲤 IL8 对抗原的识别与杀伤以及其对中性粒细胞的趋化和诱导脱粒作用,以及为研究鲤鱼 IL8 在免疫和炎症反应过程中所起的调节作用奠定基础。

[参考文献]

- [1] STRIETER RM, CHENSUE SW, BASHA MA, et al. Human Alveolar Macrophage Gene Expression of Interleukin8 By Tumor Necrosis Factor Alpha, Lipopolysaccharide, and Interleukin1 Beta [J]. *Cell Mol Biol*, 1990, (2): 321-326.
- [2] MIELKE V, BAUMAN JGJ, STICHERLING M, et al. Detection of Neutrophil-Activating Peptide NAP/IL8 and NAP/IL8 Mrna in Human Recombinant IL8 Alpha and Human Recombinant Tumor Necrosis Factor-Alpha-Stimulated Human Dermal Fibroblasts [J]. *J Immunol*, 1990, 144: 153-161.
- [3] HEBERT CA, LUSCINSKAS FW, KIELY JM, et al. Endothelial and Leukocyte Forms of IL8: Conversion by Thrombin and Interactions with Neoplastic and Interactions with Neutrophils [J]. *J Immunol*, 1990, 145: 3033-3040.
- [4] 卢强, 丰培金, 李莲瑞, 等. 有丝分裂原刺激的鲤鱼外周血白细胞 cDNA 文库的构建 [J]. *中国兽医学报*, 2004, 24 (6): 568-570.
- [5] 卢强, 丰培金, 李莲瑞, 等. 正常鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建 [J]. *中国水产学报*, 2004, 28 (5): 585-588.
- [6] YOSHIMURA T, MATSUSHIMA K, OPPENHEIM JJ, et al. Neutrophil Chemotactic Factor Produced by Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human Blood Mononuclear Leukocytes: Partial Characterization and Separation from Interleukin-1 (IL-1) [J]. *J Immunol*, 1987, 139: 788.
- [7] VAN MEIR E, CESKA M, EFFENBERGER F, et al. Interleukin8 is Produced in Neoplastic and Infectious Diseases of the Human Central Nervous System [J]. *Canc-*

- er Res, 1992, 52: 4297 - 4305.
- [8] HUISING MO, STOLTE E, FLIK G, SAVELKOUL HF, et al. Cxchemokines and Leukocyte Chemotaxis in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27 (10): 875 - 888.
- [9] OPPENHEIM J J, ZACHARIAE C O C, MUKAIDA N, et al. Properties of the Novel Proinflammatory Supergene 'Interocrine' Cytokine Family [J]. Annu. Rev Immunol, 1991, 9: 617 - 668.
- [10] DAMME J, VAN BEEUMEN J, CONINGS R, et al. Purification of Granulocyte Chemotactic Peptide/Interleukin - 8 Reveals N - Terminal Sequence Heterogeneity Similar to that of Beta-Thromboglobulin [J]. Eur J Biochem, 1989, 181: 337 - 344.



(上接第 46 页)

- [14] PETER WEYWERSTATHL, HELGA MARSCHALL. Constituent of the Flower Essential Oil of *Agertina Adenophora* (Spreng.) form India [J]. Flavour and Fragrance Journal, 1997, 12 (6), 387 - 396.
- [15] 张其红, 候太平, 刘世贵. 对紫茎泽兰中灭蚜活性物质的初步研究 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2000, 37 (3): 481 - 484.
- [16] 李云寿, 邹华英, 汪禄祥. 紫茎泽兰提取物对四种储粮害虫的沙虫活性 [J]. 昆虫知识, 2001, 38 (3): 214 - 216.
- [17] 王一丁, 高平, 刘世. 紫茎泽兰提取物对棉蚜的毒力及其灭蚜机理研究 [J]. 植物保护学报, 2002, 29 (4): 337 - 340.
- [18] 马安勤, 胡英明. 骆驼蓬等植物提取物杀虫活性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2003, 24 (1): 38 - 41.
- [19] 刘燕萍, 刘世贵. 紫茎泽兰杀螨活性物质的研究 [D]. 四川大学硕士学位论文, 2004.
- [20] DEY S, SINKA B, KALITA J. Effect of *Eupatorium adenophorum* Spreng Leaf Extracts on the Mustard Aphid, *Lipaphis Erysimi* Kalt [J]. Microscopy Research and Technique, 2005, 66 (1): 31 - 37.
- [21] 曹兵, 徐方仁, 吕文. 几种抗虫树种的化学成分分析及抗虫机理的研究 [J]. 林业科技, 1998, 23 (6): 27 - 29.
- [22] 谭仁祥. 植物成分功能 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [23] 张文平, 傅颖媛, 谢小梅. 柠檬醛、肉桂醛抗曲霉菌作用机制研究 [J]. 江西医学院学报, 2003, 43 (6): 10 - 13.
- [24] 张培花, 罗文富, 杨艳丽. 紫茎泽兰汁液及其萃取物对马铃薯晚疫病菌的抑制作用 [J]. 西南农业学报, 2006, 19 (2): 246 - 250.
- [25] 余鑫平, 冯俊涛, 刘晓明. 小花假泽兰茎中杀菌活性成分的研究 [J]. 西北植物学报, 2006, 26 (5): 1001 - 1006.
- [26] NARAYAN C B, JADAB C S. Seed Germination and Growth Inhibitory Cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng [J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, 20 (8): 1885.
- [27] 宋启示, 付昀, 杨崇仁. 紫茎泽兰的化学互感潜力 [J]. 植物生态学报, 2000, 24 (3): 362 - 365.
- [28] 郑丽, 冯玉龙. 紫茎泽兰叶片化感作用对 10 种草本植物种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 应用生态学报, 2005, 25 (10): 2872 - 2876.
- [29] 高平, 刘燕萍, 刘世贵. 紫茎泽兰醇提物的毒理学研究 [J]. 四川动物, 2005, 24 (1): 87 - 89.
- [30] OELRICHS P B, CALANASAN C A. Isolation of a Compound from *Eupatorium adenophorum* (Spreng.) [J]. Natural Toxins, 1995, 3 (5): 350 - 354.